

Präzision in der Gelelektrophorese für die Pharmazeutische Qualitätskontrolle

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Simone Schröder
aus Stadthagen

1. Referentin oder Referent:	Professor Dr. Hermann Wätzig
2. Referentin oder Referent:	apl. Professor Dr. Dirk Selmar
eingereicht am:	06.04.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am:	03.07.2009

Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Quantitative Gel Electrophoresis: Sources of Variation

Simone Schröder, Hui Zhang, Edward S. Yeung, Lothar Jänsch, Claus Zabel, Hermann Wätzig

J. Proteome Res. 2008, 7, 1226-1234

Improving precision in gel electrophoresis by stepwisely decreasing variance components – and considering individual protein properties

Simone Schröder, Asita Brandmüller, Xi Deng, Aftab Ahmed, Hermann Wätzig
eingereichter, eingeladener Artikel

Tagungsbeiträge

Reproducibility and Sources of Variability in Quantitative Two-Dimensional Gel Electrophoresis (Poster)

Simone Schröder, Hui Zhang, Edward S. Yeung, Lothar Jänsch, Claus Zabel, Hermann Wätzig

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2006, Marburg, 04.10.-07.10.2006

Quantitative Gel Electrophoresis – Sources of Variability (Poster)

Simone Schröder, Hui Zhang, Edward S. Yeung, Lothar Jänsch, Claus Zabel, Hermann Wätzig

31st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques 2007, Ghent, 17.06.-21.06.2007

Quantitative Gel Electrophoresis – Sources of Variability (Poster)

Simone Schröder, Hui Zhang, Edward S. Yeung, Lothar Jänsch, Claus Zabel,
Hermann Wätzig

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2007,
Erlangen, 10.10.-13.10.2007

Comparison of Coomassie-stained Gels Detection by Infrared, Fluorescence and
Visible Light Densitometry (Poster)

Simone Schröder, Aftab Ahmed, Hermann Wätzig

19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2008,
Danzig, 08.06.-12.06.2008

Precision and Sensitivity in Gel Electrophoresis (Vortrag)

Simone Schröder, Hui Zhang, Edward S. Yeung, Lothar Jänsch, Claus Zabel, Aftab
Ahmed, Hermann Wätzig

19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2008,
Danzig, 08.06.-12.06.2008

Protein Detection using Gel Electrophoresis: Precision and Sensitivity (Poster)

Simone Schröder, Hui Zhang, Edward S. Yeung, Lothar Jänsch, Claus Zabel, Aftab
Ahmed, Hermann Wätzig

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2008, Bonn,
08.10.-11.10.2008

Elektrophorese zur Analyse von Proteinen: Präzision und Leistungsfähigkeit
(Vortrag)

Simone Schröder, Hermann Wätzig

Jahrestagung der Fachgruppe Arzneimittelkontrolle und Pharmazeutische Analytik
2008, Bonn, 10.10.-11.10.2008

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter Anleitung von Herrn Prof. Hermann Wätzig angefertigt, dem ich an dieser Stelle ganz herzlich für die Bereitstellung und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas und die Möglichkeit zum selbständigen Arbeiten danke.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dirk Selmar für die Übernahme des Korreferats.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima. Insbesondere gilt mein Dank meinen Arbeitskreiskollegen Sascha Kühne, Xi Deng, Lukas Kaminski, Claudia Cianiulli sowie meinen ehemaligen Kollegen Phillip Hasemann, Heidi Köppel, Dr. Adhitasari Suratman, Dr. Sami El Deeb und Dr. Udo Schepers für die gute Zusammenarbeit, fachliche Unterstützung und Diskussion.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Asita Brandmüller, die während ihres Pharmaziestudiums einen großen Beitrag an dieser Arbeit geleistet hat. Shirin Ibrahim & Julia Walmann, Doreen Schliesing & Christian Jung sowie Dagiimaa Nergui & Verena Richter danke ich, die mich im Rahmen ihrer Wahlpflichtfacharbeiten bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Im Besonderen gilt mein Dank Frank Roese für die technische Unterstützung bei der Umsetzung der Mikrogele und Andreas Schenk für die Realisierung der Laserdetektion.

Dr. Johann Grünefeld, Dr. Hendrik Stukenbrock, Inis Winde und Jan Dreher danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Semesterbetreuung.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Dr. Lothar Jänsch und seiner Arbeitsgruppe am Helmholtz - Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig für die Möglichkeit, dort zu arbeiten, insbesondere gilt mein Dank Reiner Munder für die technische Unterstützung. Weiterhin danke ich Dr. Claus Zabel vom Institut für

Humangenetik der Charité Berlin für die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der 2D Gelelektrophorese und Prof. Edward S. Yeung und Dr. Hui Zhang von der Iowa State University für die gute Kooperation bei der Nativen Fluoreszenz-Detektion.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Prof. Aftab Ahmed und Nathan Nous vom College of Pharmacy der University of Rhode Island für die Möglichkeit, dort zu arbeiten, die freundliche Aufnahme und die fachliche Unterstützung. In diesem Zusammenhang danke ich Prof. John Grandin (IEP Program University of Rhode Island) für die finanzielle Unterstützung, durch die dieser Austausch realisierbar war.

Last but not least bedanke ich mich bei Dr. Ulrike Englisch und Dr. Harry Osterman der Firma LiCor Biosciences für die technische Unterstützung sowie für ihre anregenden Diskussionen.

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	i
Danksagung	iii
Symbole	xii
Abkürzungen	xv
1 Einleitung.....	1
1.1 Gelelektrophorese von Proteinen	1
1.1.1 Theoretische Grundlagen	3
1.1.1.1 Elektrophoretische Mobilität.....	3
1.1.1.2 Elektroendosmose	8
1.1.2 Instrumenteller Aufbau	11
1.1.2.1 Geräteaufbau.....	11
1.1.2.2 Gelmedien	15
1.1.3 Trenntechniken	20
1.1.3.1 Diskontinuierliche Elektrophorese (Disk-Elektrophorese)	20
1.1.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
1.1.3.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	26
1.1.3.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)	30
1.1.4 Anwendung der Gelelektrophorese	33
1.2 Bewertung von Analysemethoden	37
1.2.1 Präzision	37
1.2.2 Signal-zu-Rausch-Verhältnis.....	40
1.2.3 Detektionsgrenze / Bestimmungsgrenze	42
1.2.4 Linearität	43
1.3 Statistische Beurteilung von Analyseergebnissen.....	43
1.3.1 F-Test.....	45
1.3.2 Ausreißertests	46
1.3.3 Varianzkomponenten	47
2 Aufgabenstellung.....	49

3 Analyse der Technik der 2-DE.....	51
3.1 Arbeitstechnik	51
3.2 Detektionsmethoden	53
3.2.1 Coomassie-Färbung.....	54
3.2.2 Silberfärbung.....	55
3.2.3 Fluoreszenz-Farbstoffe	56
3.2.4 Radioaktive Markierung.....	57
3.2.5 Difference Gel Electrophoresis (DIGE).....	57
3.3 Vorüberlegungen	58
3.4 IPG-Streifen Äquilibration	59
3.5 Scan-zu-Scan Variabilität.....	63
3.6 Hintergrundsignal.....	63
3.7 Analytiker	68
3.8 Zusammenfassung	72
4 Detektion.....	74
4.1 Native Fluoreszenz	74
4.1.1 Prinzip der Detektion	74
4.1.2 Experimenteller Aufbau	75
4.1.3 Native Fluoreszenz von 1D-Gelen.....	75
4.1.4 Umsetzung des experimentellen Aufbaus zur Nativen Fluoreszenz- Detektion	79
4.1.5 Elektrophoretische Bedingungen für die Mikrogele	81
4.1.6 Abstimmungen für die Laserdetektion.....	83
4.2 NIR-Imaging System.....	88
4.2.1 Vorteile der NIR-Detektion	89
4.2.2 Leistungsfähigkeit des Odyssey Imaging Systems.....	89
4.2.3 Präzision	95
4.2.4 Linearität	95
4.2.5 Vergleich mit Fluoreszenz-Farbstoffen.....	96
4.3 Zusammenfassung	99
5 Ausreißertests	100

5.1 Ausreißerproblematik.....	100
5.2 Ausreißertests.....	101
5.2.1 Dixon	101
5.2.2 Grubbs	102
5.2.3 Nalimov	103
5.2.4 Box-Plot.....	103
5.2.5 Shapiro-Wilk-Test.....	105
5.2.6 Median Absolute Deviation (MAD) nach Huber	106
5.3 Datensätze.....	106
5.4 Die Wahl der geeigneten Irrtumswahrscheinlichkeit	107
5.5 ROC-Kurven	109
5.5.1 Ermittlung von ROC-Kurven.....	109
5.5.2 Analyse der Ausreißertests mit Hilfe der ROC-Kurven.....	112
5.6 Bewertung der Ausreißertests.....	114
5.7 Bootstrap-Verfahren.....	118
5.7.1 Das Prinzip des Bootstrap-Verfahrens	119
5.7.2 Bewertung der Datensätze mit Hilfe des Bootstraps	121
6 Versuchsdesign	124
6.1 Plackett-Burman-Versuchsdesign.....	125
6.2 Aufstellung des Plackett-Burman-Versuchsdesigns.....	126
6.3 Bewertung der Einflussfaktoren	129
6.4 Ergebnisse und Diskussion des Plackett-Burman-Versuchsdesigns	130
7 Zusammenfassung und Ausblick	137
8 Experimenteller Teil	143
8.1 Geräte und Software.....	143
8.1.1 2D-Gelelektrophorese-System	143
8.1.2 1D-Gelelektrophorese-System	143
8.1.3 Mikrogele.....	143
8.1.4 Scanner und Detektoren	144

8.1.5 weitere Geräte.....	144
8.1.6 Software	145
8.2 Reagenzien und Chemikalien	145
8.3 2D-Gelelektrophorese.....	148
8.3.1 Probenvorbereitung.....	148
8.3.2 Isoelektrische Fokussierung.....	149
8.3.3 Äquilibration	151
8.3.4 SDS-PAGE.....	151
8.3.5 Detektion	152
8.4 1D-Gelelektrophorese.....	153
8.4.1 Untersuchung des Gelhintergrundes.....	153
8.4.1.1 Probenvorbereitung	153
8.4.1.2 SDS-PAGE	153
8.4.2 Umsetzung der Nativen Fluoreszenz-Detektion	154
8.4.2.1 Coomassie-Färbung nach Kang	155
8.4.2.2 Native Fluoreszenz-Detektion.....	155
8.4.3 NIR-Detektion.....	157
8.4.3.1 Probenvorbereitung	157
8.4.3.2 SDS-PAGE	158
8.4.3.3 Coomassie-Färbung	158
8.4.3.4 Sypro Ruby-Färbung	158
8.4.3.5 Deep Purple Färbung	159
8.4.4 Plackett-Burman-Versuchsdesign	159
8.4.4.1 Probenvorbereitung	159
8.4.4.2 SDS-PAGE	159
8.4.4.3 Detektion	160
9 Anhang	161
9.1 Präzisionen und Signal-zu-Rausch-Verhältnisse der verschiedenen Detektoren und Farbstoffe	161
9.2 Berechnungen zum Plackett-Burman-Versuchsdesign.....	168
9.2.1 β -Galactosidase	168
9.2.2 Phosphorylase B	170

9.2.3 BSA	172
9.2.4 Glutamatdehydrogenase	174
9.2.5 Laktatdehydrogenase	176
9.2.6 Carboanhydrase	178
9.2.7 Trypsin Inhibitor	180
10 Literaturverzeichnis	182
11 Lebenslauf	189

Symbole

a	Masse des Acrylamids [g]
$a_{n,n-i+1}$	tabellierte Shapiro-Wilks-Konstante
α	Dissoziationsgrad
α	Irrtumswahrscheinlichkeit
b	Masse des Quervernetzlers (z.B. <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid) [g]
b	Bootstrap-Stichprobe
$b_{0,5}$	Peakhalbwertsbreite
C	Vernetzungsgrad (cross-linking agent)
d	Abstand zwischen den Elektroden [m]
e	elektrische Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19}$) [A · s]
E	elektrische Feldstärke [$V \cdot m^{-1}$]
E_{Di}	Effekt eines Dummyfaktors
E_k	berechneter Effekt eines Faktors k
ϵ	Dielektrizitätskonstante [$F \cdot m^{-1}$]
f_c	Reibungskoeffizient
F_0	berechneter, kritischer F-Wert
F_{krit} bzw. $F_{n_1-1, n_2-1, \alpha}$	tabellierter Wert für den F-Test
F_e	elektrische Feldkraft [N]
F_R	Reibungskraft [N]
F_{rel}	Relaxationskraft [N]
F_{ret}	Retardationskraft [N]
h	h-spread, Bereich zwischen den Angelpunkten beim Box-Plot
h_n	Schwankung der Basislinie
h_o	oberer Angelpunkt (hinges) beim Box-Plot
h_u	unterer Angelpunkt (hinges) beim Box-Plot
H	Höhe des Messsignals / Peaks
H_0	Nullhypothese
H_1	Alternativhypothese
I	elektrischer Strom [A]
K_a	Säurekonstante

K_R	Retardationskoeffizient
m	Median der Stichprobe
M	molare Masse des Moleküls [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
μ	absolute elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
μ_{eff}	effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
μ_{EOF}	Mobilität des elektroosmotischen Flusses [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
μ_r	relative Mobilität
n	Stichprobenumfang
η	Viskosität des Mediums [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]
pH	negativ dekadische Logarithmus der Oxoniumionen-Konzentration
pK_a	negativ dekadische Logarithmus der Dissoziationskonstante einer Säure
P	elektrische Leistung [W]
P	statistische Sicherheit
q	Ladung des Teilchens [$\text{A} \cdot \text{s}$]
Q_{eff}	effektive Ladung des Teilchens [$\text{A} \cdot \text{s}$]
r	Radius des Teilchens [m]
R_{eff}	effektiver Radius des Teilchens [m]
$r_{1-\alpha}$	berechnete Prüfgröße für den Ausreißertest nach Dixon
$r_{n;1-\alpha}$	berechnete Prüfgröße für den Ausreißertest nach Nalimov
σ	Standardabweichung der Grundgesamtheit
$\hat{\sigma}$	Standardabweichung einer Stichprobe
$\hat{\sigma}_b^*$	Standardabweichung der Bootstrap-Stichprobe
$\hat{\sigma}_r$	Wiederhol-Standardabweichung (repeatability)
$\hat{\sigma}^2$	Varianz
$\hat{\sigma}_{\text{pooled}}^2$	gepoolte Varianz
θ	statistisch interessanter Parameter beim Bootstrap
$\hat{\theta}^*$	Bootstrap-Verteilung
$\hat{\theta}_b^*$	interessanter Parameter jeder einzelnen Bootstrap-Stichprobe
t	t-Faktor

t	Zeit [s]
T	Gesamtacrylamidkonzentration (total acrylamid concentration)
$T_{n;1-\alpha}$	berechnete Prüfgröße für den Ausreißertest nach Grubbs
U	elektrische Spannung [V]
v	Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens [$m \cdot s^{-1}$]
V	Volumen einer Lösung [ml]
W	elektrische Energie [$W \cdot s$]
W	berechnete Prüfgröße für den Shapiro-Wilk-Test
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
\bar{x}_b^*	Mittelwert der Bootstrap-Stichprobe
x_c	kritischer Wert
x_i	Messwert der Stichprobe
x_n	Extremwert (größter / kleinster Wert)
x	spezifischer Faktor für die Molekülart
$\hat{y}(x_i)$	Regressionsgerade
Y_k	ermittelte Zielgröße eines Faktors k
z	Ladungszahl
ζ	Zeta-Potenzial [V]

Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
AUC	Fläche unter der Kurve (engl.: area under the curve)
BIS	Bisacrylamid (<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid)
BSA	Bovine Serum Albumin
CAF	Celluloseacetatfolien
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCB	Colloidal Coomassie Blue
CE	Kapillarelektrophorese
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonat
CV	Variationskoeffizient (engl.: Coefficient of Variation)
DC	Dünnschichtchromatographie
2-DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
Disk	diskontinuierliche Elektrophorese
DL	Nachweisgrenze (engl.: Detection Limit)
DTT	Dithiothreitol
ICH	International Conference on Harmonisation
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierten pH-Gradienten
KISS	Korrektes Integrations-Software System
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MCD	Minimum Covariance Determinant
MVE	Minimum Volume Ellipsoid
MVT	Multivariate Trimming
MIN	Minimum Significant Factor Effect ; Grenzwert für das Plackett-Burman-Versuchsdesign
NIR	Nahes-Infrarot (engl.: near-infrared)
OFAT	one-factor-at-a-time-Methode
pI	isoelektrischer Punkt
Ph. Eur.	European Pharmacopeia
QL	Bestimmungsgrenze (engl.: Quantitation Limit)
RHM	Resampling by Half-Means

ROC-Kurve	Receiver-Operating-Characteristic-Kurve
RSD%	prozentuale relative Standardabweichung
RuBPS	Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthroline disulfonate)
SHV	Smallest Half-Volume
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USP	United States Pharmacopeia

1 Einleitung

1.1 Gelelektrophorese von Proteinen

Seit Einführung des Insulins als erstes gentechnisch hergestelltes Protein zu therapeutischen Zwecken Ende der 70er Jahre hat die Anzahl der biotechnologischen Produkte rapide zugenommen. Durch die rasante Entwicklung und die wachsende Zahl von Biotherapeutika gewinnen leistungsfähige Methoden zur Charakterisierung und Qualitätskontrolle dieser Produkte immer mehr an Bedeutung. Die meist verbreitete Analysentechnik in der Proteinanalytik ist die Gelelektrophorese. Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes. Unterschiedliche Ladung und Größe der Teilchen bewirken eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit und führen so zu Trennungseffekten (Abbildung 1-1), die sich analytisch und präparativ auswerten lassen.

Elektrophoretische Trennungen führt man in unterschiedlichen Medien durch. Man unterscheidet zwei Gruppen elektrophoretischer Verfahren: (i) die trägerfreie Elektrophorese und (ii) die trägergestützte Elektrophorese, wobei die trägergestützten Systeme die trägerfreien an Bedeutung übertreffen. Bei der trägerfreien Elektrophorese erfolgt die Wanderung der Teilchen direkt in der Pufferlösung (in offenen Kapillaren oder in dünnen Pufferschichten). Die Trennung hängt hier ausschließlich von der Ladung der Teilchen ab. Bei der trägergestützten Elektrophorese erfolgt die elektrophoretische Wanderung der Teilchen in stabilisierenden Matrices. Als Träger kommen puffergetränkte Filterpapiere und Folien (z.B. Celluloseacetatfolien) sowie verschiedene Gele (Agarose, Stärke, Polyacrylamid) zum Einsatz. In der Analytik geladener Moleküle wie Nukleinsäuren und Proteinen hat die Elektrophorese in stabilisierenden Matrices große Bedeutung erlangt. Von Vorteil dabei sind die sehr geringen Substanzmengen, die für die Analytik benötigt werden. Die getrennten Substanzen können direkt im Träger sichtbar gemacht werden, ohne diese zuvor aus dem Träger eluieren zu müssen. Die Wanderungsgeschwindigkeiten der Teilchen werden in diesen porösen Matrices je nach Größe unterschiedlich verzögert, so dass die Trennung in diesem Fall nicht nur

von der Ladung der Teilchen abhängig ist sondern auch von ihrer Größe. Der Träger funktioniert somit wie ein Sieb und erhöht dadurch die elektrophoretische Auflösung.

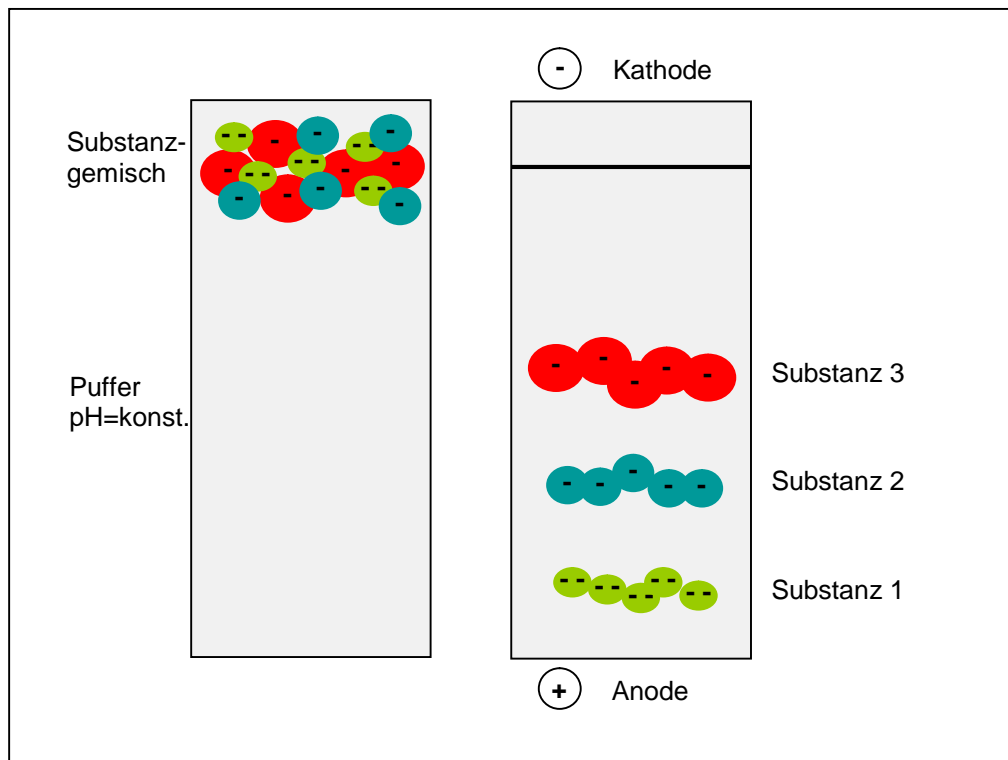


Abbildung 1-1: Trennprinzip der Elektrophorese: Geladene Teilchen unterschiedlicher Ladung und Größe wandern im elektrischen Feld mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten, wodurch die einzelnen Substanzen diskrete Zonen bilden.

Die Papierelektrophorese wird auf Glas- oder Kunststoffplatten durchgeführt, die mit Kieselgel, Aluminiumoxid oder Cellulosepulver beschichtet sind. Allerdings ist die Papierelektrophorese heute völlig durch die Gelelektrophorese ersetzt und hat nur noch historische Bedeutung. Celluloseacetatfolien besitzen sehr große Poren, die praktisch über keine Siebwirkung mehr verfügen. Diese Matrix wirkt der Diffusion kaum entgegen, so dass sehr breite Banden mit einem geringen Auflösungsvermögen und somit einer sehr hohen Nachweisgrenze entstehen. Daher sind auch die Celluloseacetatfolien heute fast komplett von der Gelelektrophorese verdrängt. Sie finden aber zum Teil noch Anwendung in der klinischen Routineanalytik zur elektrophoretischen Bestimmung von Serumproteinen. Die in der

Gelelektrophorese am häufigsten verwendeten Träger sind Polyacrylamid- und Agarosegele.

Weitere Kriterien können herangezogen werden, um die vielfältigen elektrophoretischen Trennverfahren zu klassifizieren: Trennmedium, Trennprinzip, Elektrolytverteilung in Trennmedium oder Nativität (Struktur und biochemische Eigenschaften) der zu trennenden Teilchen. Auf weitere Klassifizierungen aus der Gruppe der trägergestützten Elektrophorese, die auf verschiedenen Trennprinzipien beruhen, wird genauer in Kapitel 1.1.3 eingegangen.

1.1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1.1 Elektrophoretische Mobilität

Im elektrischen Feld wirken unterschiedliche Kräfte auf geladene Teilchen. Die elektrische Kraft F_e (Gleichung 1) wirkt auf die Ladung q des Teilchens, beschleunigt dieses und transportiert es somit zum elektrischen Gegenpol:

$$F_e = q \cdot E \quad \text{mit} \quad q = z \cdot e \quad (\text{Gleichung 1})$$

F_e : elektrische Feldkraft [N]

q : Ladung des Teilchens [A · s]

E : elektrische Feldstärke [V · m⁻¹]

z : Ladungszahl

e : elektrische Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19}$) [A · s]

Dieser elektrischen Kraft F_e wirkt die Reibungskraft F_R (Gleichung 2) entgegen, mit der das Teilchen gebremst wird.

$$F_R = f_c \cdot v \quad (\text{Gleichung 2})$$

F_R : Reibungskraft [N]

f_c : Reibungskoeffizient

v : Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens [m · s⁻¹]

Auf kleine, kugelförmige Teilchen lässt sich das Stokes'sche Gesetz anwenden, um die Reibungskraft F_R zu berechnen. Gleichung 3 zeigt, dass diese Reibungskraft F_R direkt proportional zum Teilchenradius r , zur Viskosität η des Mediums und zur Wanderungsgeschwindigkeit v des Teilchens im elektrischen Feld ist.

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \quad (\text{Gleichung 3})$$

F_R : Reibungskraft [N]

r : Radius des Teilchens [m]

η : Viskosität des Mediums [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]

v : Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

Nach kurzer Beschleunigung der Teilchen durch Anlegen der elektrischen Feldstärke kompensiert die Reibungskraft F_R die beschleunigende elektrische Kraft F_e . Es stellt sich ein Kräftegleichgewicht (Gleichung 4) ein, so dass sich die Teilchen mit konstanter Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld weiter bewegen. Durch Einsetzen der Formeln für die elektrische Kraft F_e (Gleichung 1) und die Reibungskraft F_R (Gleichung 3) in das Kräftegleichgewicht (Gleichung 4) lässt sich die Wanderungsgeschwindigkeit v gemäß Gleichung 6 berechnen.

$$F_e = F_R \quad (\text{Gleichung 4})$$

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \quad (\text{Gleichung 5})$$

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} = \frac{z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (\text{Gleichung 6})$$

v : Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

r : Radius des Teilchens [m]

η : Viskosität des Mediums [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]

q : Ladung des Teilchens [$\text{A} \cdot \text{s}$]

E : elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]

z : Ladungszahl

e : elektrische Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19}$) [$\text{A} \cdot \text{s}$]

Wie aus Gleichung 6 hervorgeht, ist die Wanderungsgeschwindigkeit v der Teilchen direkt proportional zu der elektrischen Feldstärke E . Die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen hängt somit von den Versuchsbedingungen ab. Um eine bessere Vergleichbarkeit aller experimenteller Daten zu erzielen, wird die Wanderungsgeschwindigkeit auf die elektrische Feldstärke bezogen. Der Quotient aus Wanderungsgeschwindigkeit v und elektrischer Feldstärke E (Gleichung 7) liefert eine neue Größe, die (absolute) elektrophoretische Mobilität μ . Diese Größe ist geräteunabhängig und bietet somit eine allgemein gültige Möglichkeit, das Wanderungsverhalten der Teilchen zu charakterisieren. Unter isothermen Bedingungen ist die elektrophoretische Mobilität eine für einen Stoff charakteristische Konstante.

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (\text{Gleichung 7})$$

v : Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

r : Radius des Teilchens [m]

η : Viskosität des Mediums [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]

q : Ladung des Teilchens [$\text{A} \cdot \text{s}$]

E : elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]

z : Ladungszahl

e : elektrische Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19}$) [$\text{A} \cdot \text{s}$]

Die vorangegangenen Gleichungen gelten prinzipiell nur für sphärische, kugelförmige Teilchen sowie für unendlich verdünnte Lösungen. Um dieses vereinfachte Modell auf reale Elektrolytlösungen anwenden zu können, müssen noch einige Modifikationen vorgenommen werden.

Die wandernden Ionen sind in wässrigen Lösungen nicht nur von einer Solvathülle umgeben wie in idealen, unendlich verdünnten Lösungen, sondern stehen auch in Wechselwirkung mit entgegengesetzt geladenen Ionen. Diese Gegenionen werden von den Teilchen angezogen, wodurch sich eine Ionenatmosphäre um das wandernde Ion ausbildet. Als Konsequenz ergibt sich ein größerer Teilchenradius R_{eff} als der angenommene Radius r und eine geringere effektive Ladung Q_{eff} der

Teilchen. Unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften erhält man eine neue Größe, die effektive elektrophoretische Mobilität μ_{eff} (Gleichung 8).

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{v}{E} = \frac{Q_{\text{eff}}}{6 \cdot \pi \cdot R_{\text{eff}} \cdot \eta} \quad (\text{Gleichung 8})$$

v : Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

R_{eff} : effektiver Radius des Teilchens [m]

η : Viskosität des Mediums [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]

Q_{eff} : effektive Ladung des Teilchens [$\text{A} \cdot \text{s}$]

E : elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]

z : Ladungszahl

e : elektrische Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19}$) [$\text{A} \cdot \text{s}$]

Für nichtkugelförmige Teilchen wie Peptide und Proteine lässt sich die elektrophoretische Mobilität empirisch ermitteln aus dem Quotienten aus Ladung des Teilchens und molarer Masse M des Moleküls (Gleichung 9):

$$\mu = k \cdot \frac{q}{M^x} \quad (\text{Gleichung 9})$$

k : Proportionalitätskonstante

q : Ladung des Teilchens [$\text{A} \cdot \text{s}$]

M : molare Masse des Moleküls [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

x : spezifischer Faktor für die Molekülart

Je nach Molekülart wird der spezifische Faktor mit einem Wert zwischen 1/3 und 2/3 beschrieben. Für Peptide und Proteine beträgt er 2/3 [1]. Der Quotient aus Ladung und Masse wird auch als Ladungsdichte bezeichnet und dient dazu, Voraussagen über das elektrophoretische Trennverhalten von Stoffen zu machen.

Der pH-Wert des Puffers beeinflusst die Ladung der wandernden Teilchen. Starke Elektrolyte, die praktisch vollständig dissoziiert vorliegen, üben keinen Einfluss auf die Mobilität der Ionen aus. Bei schwachen Säuren und Basen sowie bei Ampholyten dagegen sind die Ionenbeweglichkeiten eine Funktion des Dissoziationsgrades α des Elektrolyten und damit auch des pH-Wertes (Gleichung 10).

$$\mu_{\text{eff}} = \alpha \cdot \mu \quad (\text{Gleichung 10})$$

μ_{eff} :	effektive elektrophoretische Mobilität
α :	Dissoziationsgrad
μ :	absolute elektrophoretische Mobilität

Unter Einbeziehung des Massenwirkungsgesetzes lässt sich die effektive Mobilität für eine schwache Base (Gleichung 11) und für eine schwache Säure (Gleichung 12) folgendermaßen errechnen:

$$\mu_{\text{eff}} = \mu \cdot \frac{[\text{C}_{\text{H}_3\text{O}^+}]}{[\text{C}_{\text{H}_3\text{O}^+}] + K_A} = \frac{\mu}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}} \quad (\text{Gleichung 11})$$

$$\mu_{\text{eff}} = -\mu \cdot \frac{K_A}{[\text{C}_{\text{H}_3\text{O}^+}] + K_A} = \frac{-\mu}{1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pH}}} \quad (\text{Gleichung 12})$$

μ_{eff} :	effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
μ :	absolute elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
$[\text{C}_{\text{H}_3\text{O}^+}]$:	Konzentration der Oxoniumionen
K_a :	Säurekonstante
pK_a :	negativ dekadische Logarithmus der Dissoziationskonstante einer Säure

Die effektive Mobilität ist somit vom pH-Wert abhängig. Definitionsgemäß wird die Mobilität anionischer Verbindungen zur Anode mit einem Minuszeichen versehen.

Durch Ausbildung der Ionenatmosphäre (Ionenwolke) um das wandernde Ion, dessen Größe von der Ionenstärke abhängig ist, gewinnen zwei weitere Kräfte an Bedeutung, die Relaxationskraft und die Retardationskraft, die die effektive Mobilität beeinflussen. Die Kraft, die das elektrische Feld auf die Ionen der Ionenatmosphäre ausübt, wird direkt auf die Lösungsmittelmoleküle übertragen, wodurch das wandernde Ion sich nicht in einer stationären Flüssigkeit bewegt, sondern in einer Lösung, die in die entgegengesetzte Richtung fließt. Dieser Retardationseffekt sorgt dafür, dass eine bremsende Kraft, die Retardationskraft, die Geschwindigkeit des

wandernden Ions verringert. Beim Anlegen des elektrischen Feldes bewegt sich die Ionenwolke langsamer als das wandernde Ion und „hinkt“ diesem somit hinterher, wodurch eine weitere bremsende Kraft (Relaxationskraft) auf das wandernde Teilchen einwirkt. Aufgrund dieser beiden Effekte nimmt die Mobilität des wandernden Ions mit steigender Ionenstärke ab. Alle Kräfte, die im elektrischen Feld die Wanderungsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens beeinflussen, sind in Abbildung 1-2 dargestellt.

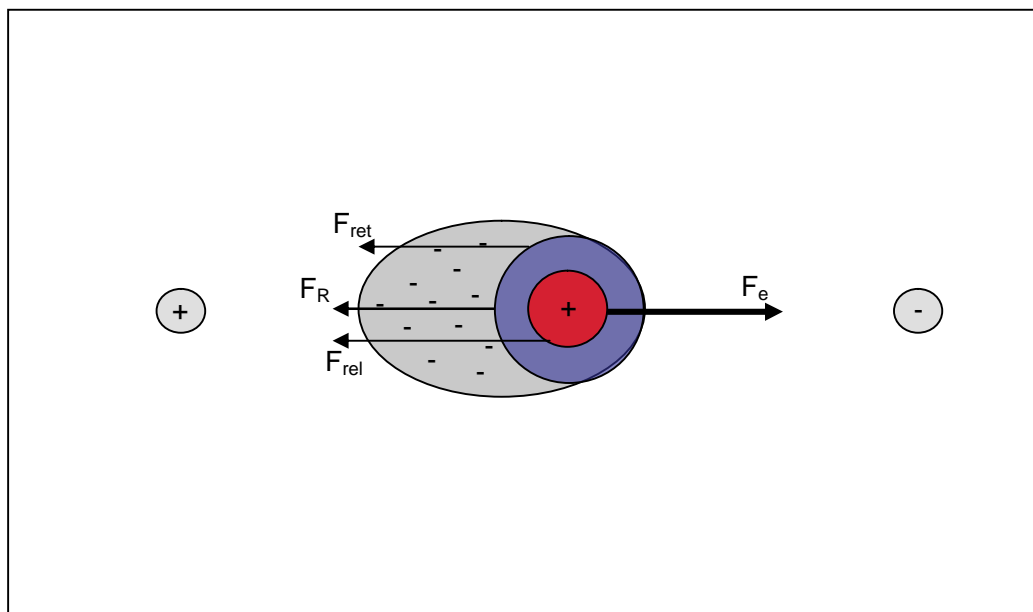


Abbildung 1-2: Beschleunigende und bremsende Kräfte, die in einem elektrischen Feld auf ein geladenes, hydratisiertes Teilchen mit Ionenwolke wirken (F_e : elektrische Feldkraft; F_R : Reibungskraft; F_{rel} : Relaxationskraft; F_{ret} : Retardationskraft)

1.1.1.2 Elektroendosmose

Viele Materialien (Agarose, Celluloseacetatfolien, Glas, Papier, Quarz (fused silica)) bilden aufgrund ihrer Oberflächenladung beim Kontakt mit einer Elektrolytlösung eine elektrochemische Doppelschicht aus. So werden z.B. bei einem pH-Wert oberhalb von 7 die Carboxylgruppen einer Gelmatrix deprotoniert, so dass sich die Geloberfläche negativ auflädt. Diese negativen Ladungen werden durch die positiven Gegenladungen aus dem dissoziierten Puffersystem kompensiert. Diese Doppelschicht setzt sich aus einer starren, auch als Sternschicht oder innere

Helmholtz-Schicht bezeichnet, und einer diffusen Schicht, äußere Helmholtz-Schicht, zusammen. Je geringer die Ionenstärke des Puffersystems ist, desto weiter reicht die diffuse Doppelschicht ins Lösungsinere hinein. Aufgrund der Ladungsverteilung zwischen diesen beiden Schichten entsteht ein Potenzial (Abbildung 1-3), welches in der starren Schicht linear und in der diffusen Schicht exponentiell abnimmt. Letzteres wird als ζ -Potenzial (Zeta-Potenzial) bezeichnet.

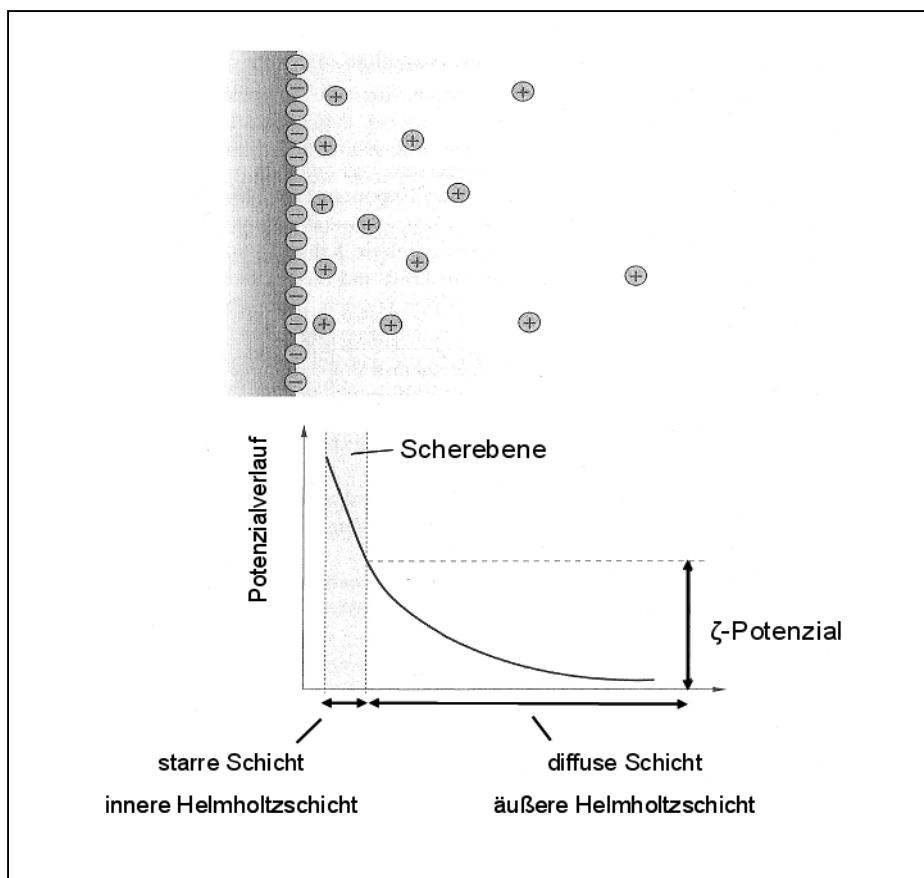


Abbildung 1-3: Aufbau und Potenzialverlauf der elektrochemischen Doppelschicht; aus [2].

Das Anlegen einer elektrischen Spannung sorgt nun dafür, dass sich die positiven Gegenladungen samt der Flüssigkeit in Richtung Kathode bewegen. Diese Strömung der flüssigen Phase bezeichnet man als elektroosmotischen Fluss (EOF). In der Gelelektrophorese verwendet man häufiger den Begriff der Elektroendosmose. Das Prinzip der Elektroendosmose veranschaulicht Abbildung 1-4. Die Mobilität des

elektroosmotischen Flusses μ_{EOF} ist proportional zur Dielektrizitätskonstante ϵ und zum ζ -Potenzial und umgekehrt proportional zur Viskosität η des Mediums (Gleichung 13).

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (\text{Gleichung 13})$$

μ_{EOF} : Wanderungsgeschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]

ϵ : Dielektrizitätskonstante [$\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$]

ζ : Zeta-Potenzial [V]

η : Viskosität des Mediums [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]

Die Wanderungsgeschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses v_{EOF} ist proportional zur angelegten elektrischen Feldstärke E (Gleichung 14).

$$v_{\text{EOF}} = \mu_{\text{EOF}} \cdot E = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \cdot E \quad (\text{Gleichung 14})$$

v_{EOF} : Wanderungsgeschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

ϵ : Dielektrizitätskonstante [$\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$]

ζ : Zeta-Potenzial [V]

η : Viskosität des Mediums [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]

E : elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]

Die Richtung des EOF ist der Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten entgegengerichtet, was zu unerwünschten Verzerrungen und Verdünnungen der Zonen führt. Um der Elektroendosmose entgegenzuwirken, sollten möglichst ladungsfreie Materialien und Trennmedien zum Einsatz kommen.

Im elektrischen Feld wandern somit nicht nur die zu trennenden Substanzen, sondern auch, und zwar im hohen Maße, die Ionen der dissoziierten Pufferkomponenten. Daher wird an beiden Elektroden ein Pufferreservoir benötigt, das eine hohe Pufferkonzentration und -menge enthält, um so zu gewährleisten, dass der Puffer während der Elektrophorese nicht erschöpft.

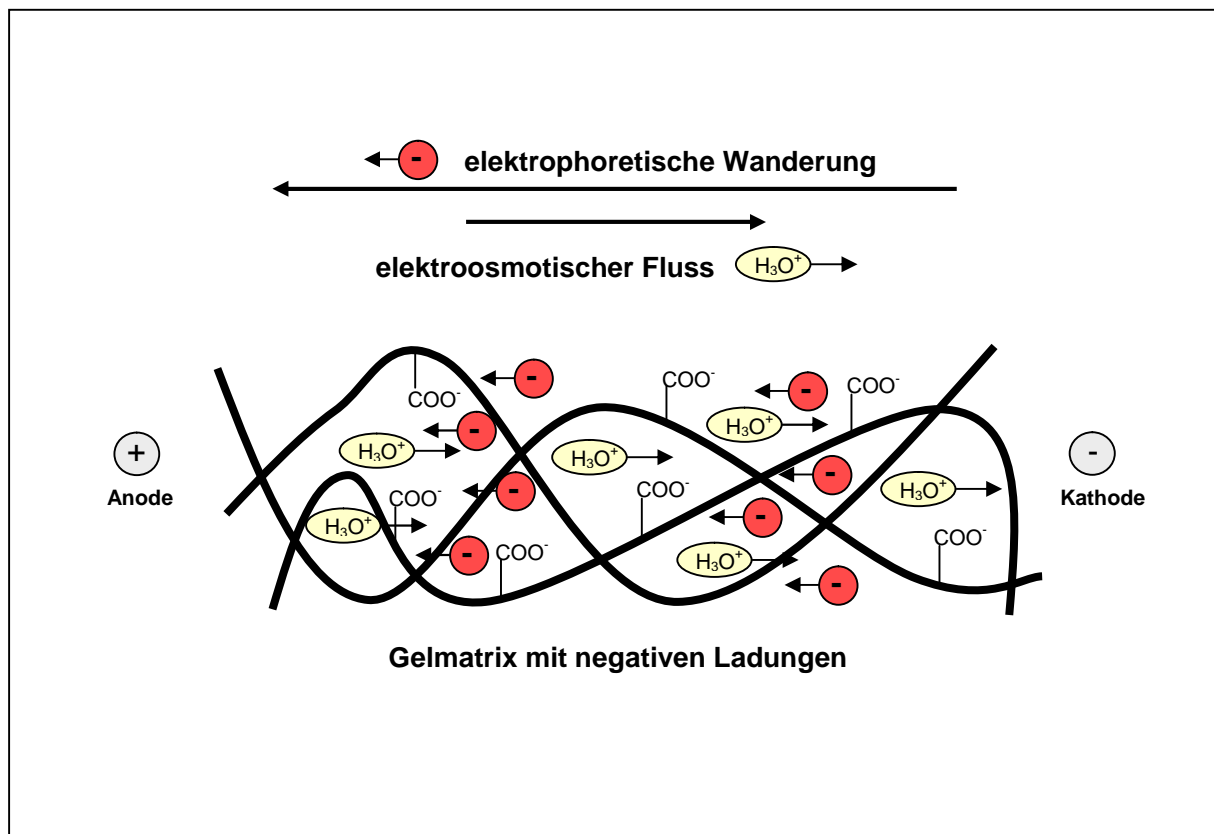


Abbildung 1-4: Elektroendosmose: bei pH-Werten über 7 werden die Carboxylgruppen im Gel negativ geladen. Dadurch trägt die Gelmatrix fixierte Ladungen, wodurch im elektrischen Feld ein elektroosmotischer Fluss entsteht, der der Elektrophoreserichtung entgegengesetzt ist.

1.1.2 Instrumenteller Aufbau

1.1.2.1 Geräteaufbau

Die wichtigsten Bestandteile zur Durchführung elektrophoretischer Verfahren in Gelmedien sind die Elektrophoresekammer (Trennkammer, Laufkammer), die Spannungsquelle und das Kühlthermostat.

Die elektrophoretische Trennung wird in einer Trennkammer durchgeführt, die aus isolierten Materialien wie z.B. Plexiglas, Glas oder Keramik besteht. Die Stromzufuhr erfolgt über Platindrähte (0,3 – 0,5 mm), die in einen Puffertank eintauchen. Die Gele werden als Rundgele oder Flachgele in einer Gießkassette gegossen und

anschließend in eine vertikale oder horizontale Trennkammer eingesetzt, in der die anschließende elektrophoretische Trennung erfolgt. Flachgele werden allerdings gegenüber den Rundgelen bevorzugt eingesetzt, da die Anfärbung der getrennten Stoffe in ihnen viel schneller erfolgen kann, und diese Gele einfach mittels Densitometern oder Scannern ausgewertet werden können. Außerdem können die Flachgele getrocknet und somit für lange Zeit aufbewahrt werden.

Elektrophoretische Verfahren können in vertikalen oder horizontalen Elektrophoresekammern durchgeführt werden. Bei den vertikalen Systemen sind die Gele vollständig von Glasröhrchen (Rundgele) (Abbildung 1-5 A) bzw. Glasplatten (Flachgele) (Abbildung 1-5 B) und den Puffern eingeschlossen. Die Probe wird oben auf das Gel entweder in die Röhrchen der Rundgele oder in die Probentaschen der Flachgele mit Hilfe von Spritzen oder Mikropipetten aufgetragen. Die Probelösung wird mit Glycerin beschwert und unter den Laufpuffer unterschichtet.

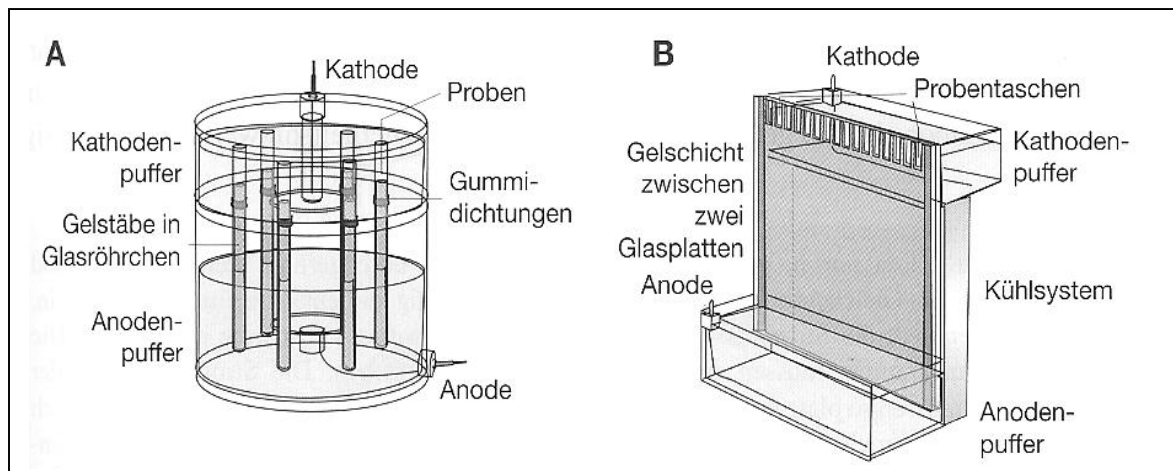


Abbildung 1-5: Vertikale Elektrophoreseapparaturen: (A) Rundgelapparat; (B) Flachgelapparat. Die Probentaschen werden bei der Gelherstellung mit Hilfe eines Kamms erzeugt; aus [2].

Bei horizontalen Systemen werden meist Gele verwendet, die auf eine inerte Folie oder dünne Glasplatte aufgebracht sind (Abbildung 1-6). Die Gele liegen direkt auf der Kühlplatte, dabei ist die Oberfläche offen. Die Kontaktelektroden befinden sich auf beweglichen Elektrodenhaltern, so dass man eine Apparatur für Gele unterschiedlicher Größe verwenden kann. Für die Elektrophorese in horizontalen

Systemen werden keine großen Puffervolumina benötigt. Die Elektrophorese funktioniert auch mit Filterstreifen, die mit konzentrierten Puffern getränkt sind (Abbildung 1-6). Die Probe wird direkt in die Probenwannen pipettiert, welche bei der Gelherstellung mit Hilfe einer Schablone erzeugt wurden.

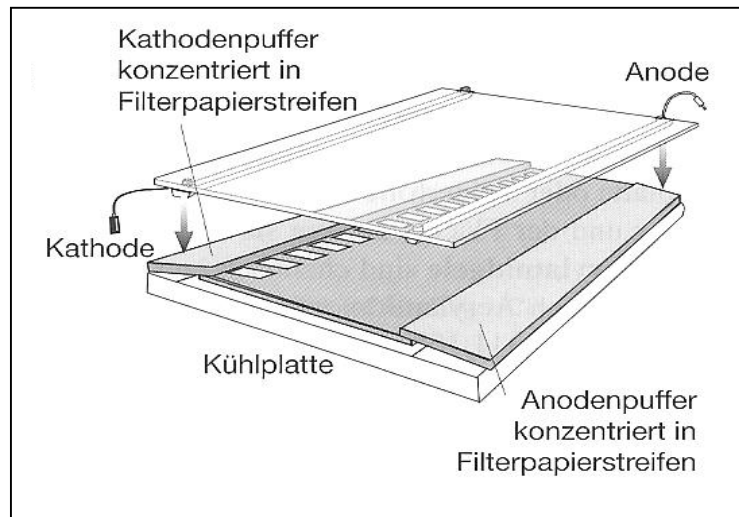


Abbildung 1-6: Horizontales Elektrophoresesystem. Meist werden Gele verwendet, die auf einer Trägerfolie stabilisiert sind. Die Elektroden werden von oben auf die Elektrodenstreifen aufgelegt, die mit konzentriertem Elektrodenpuffer getränkt sind; aus [2].

Das elektrische Feld ist durch seine Feldstärke E charakterisiert, welche direkt proportional zur angelegten Spannung U und umgekehrt proportional zum Abstand d zwischen den Elektroden ist (Gleichung 15):

$$E = \frac{U}{d} \quad (\text{Gleichung 15})$$

E : elektrische Feldstärke [$V \cdot m$]

U : elektrische Spannung [V]

d : Abstand zwischen den Elektroden [m]

Der Abstand zwischen den Elektroden ist durch den gewählten apparativen Aufbau bzw. durch die gewählte Gelgröße festgelegt und bleibt daher während der gesamten

Elektrophorese konstant. Eine Veränderung der Feldstärke kann somit nur durch eine Veränderung der angelegten elektrischen Spannung erreicht werden. Je nach Gelelektrophoreseart werden Spannungen von 50 V bis hin zu 5000 V bei Stromstärken von 5 mA bis zu 100 mA verwendet, um das für die Trennung notwendige elektrische Feld aufzubauen.

Das Produkt aus elektrischer Spannung U und der elektrischen Stromstärke I wird als elektrische Leistung P bezeichnet (Gleichung 16).

$$P = U \cdot I \quad \text{(Gleichung 16)}$$

P : elektrische Leistung [W]
 U : elektrische Spannung [V]
 I : elektrischer Strom [A]

$$W = P \cdot t \quad \text{(Gleichung 17)}$$

W : elektrische Energie [W · s]
 P : elektrische Leistung [W]
 t : Zeit [s]

Während der Elektrophorese entsteht elektrische Energie, die sich als Produkt aus der elektrischen Leistung und der Zeit nach Gleichung 17 berechnen lässt. Die elektrische Energie wird in Joulesche Wärme umgewandelt und erwärmt somit das komplette System. Viele Stoffe, die gelelektrophoretisch untersucht werden wie z. B. Proteine, sind jedoch wärmeempfindliche Substanzen. Daher muss die Laufkammer während der gesamten Elektrophorese mit Hilfe von Thermostaten gekühlt werden. Die Thermostate temperieren eine Flüssigkeit bis zu einer gewünschten Temperatur und pumpen diese durch die Elektrophoresekammer. Auf diese Weise wird die Temperatur während des Laufs im gesamten System konstant gehalten. In der Regel werden die elektrophoretischen Verfahren bei Temperaturen von 10 – 15°C durchgeführt, es gibt allerdings auch Verfahren, die höhere Temperaturen benötigen.

Nach erfolgter Trennung der untersuchten Substanzen im Gel müssen diese für eine weitere Untersuchung zunächst sichtbar gemacht werden. Dazu stehen verschiedene Färbemethoden zur Verfügung (vgl. Kapitel 3.2). Zur Auswertung der Gele werden Densitometer, Kameras oder Scanner eingesetzt, welche die angefärbten Gele in digitale Signale umsetzen. Mit einer geeigneten Auswertesoftware [3-7] können die Banden bzw. Spots anschließend quantitativ und qualitativ untersucht und gegebenenfalls mit Datenbanken [8] verglichen werden.

1.1.2.2 Gelmedien

Stärke, Agarose und Polyacrylamid sind bekannte Trägermaterialien, die in der Gelelektrophorese zum Einsatz kommen. Sie besitzen gegenüber anderen Trägern wie z.B. Acetylcellulose oder Papier den Vorteil, dass sich ihre Porenstruktur je nach Trennproblematik einstellen lässt. Aufgrund der Trenneigenschaften werden zwei Geltypen unterschieden: (i) Gele, die praktisch keinen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit der zu trennenden, geladenen Teilchen haben und (ii) Gele, die die Wanderung der geladenen Teilchen entsprechend ihrer Größe im unterschiedlichen Maß behindern. Im zweiten Fall übt das Gel einen Molekularsiebeffekt aus. Bei beiden Geltypen werden die geladenen Teilchen entsprechend ihrer physikalischen Eigenschaften (Ladung, Größe, Form) getrennt. Darüber hinaus ist es jedoch auch möglich, biospezifische Adsorptionseigenschaften von Proteinen zu ihrer elektrophoretischen Trennung einzusetzen. Diese spezielle Art der Gelelektrophorese wird als Affinitätselektrophorese bezeichnet.

Die Gelmedien können selbst hergestellt werden. Es gibt allerdings auch eine Reihe von Firmen, die fertige Gele in unterschiedlichen Größen und für unterschiedliche Trenntechniken anbieten.

Stärkegele werden aus teilweise hydrolysierten Kartoffelstärke hergestellt. Dieses Naturprodukt stellt ein enzymfreundliches und speziell für Enzyme hochauflösendes Trennmedium dar, welches daher Anwendung in der Human- und Populationsgenetik [9] zur Trennung multipler Formen einzelner Enzyme findet. Allerdings finden die Stärkegele heute nur noch selten Anwendung. Aufgrund ihrer variierenden

Eigenschaften, die zu einer mangelnden Reproduzierbarkeit führen, sind sie weitestgehend von Agarose- und Polyacrylamidgelen abgelöst worden.

Agarose ist ein lineares Polysaccharid bestehend aus D-Galactose und 3,6-Anhydrogalactose, die glycosidisch miteinander verknüpft sind (Abbildung 1-7). Sie ist einer der beiden Hauptkomponenten des Agars und wird aus roten Meeresalgen nach Entfernung des Agaropektins gewonnen.

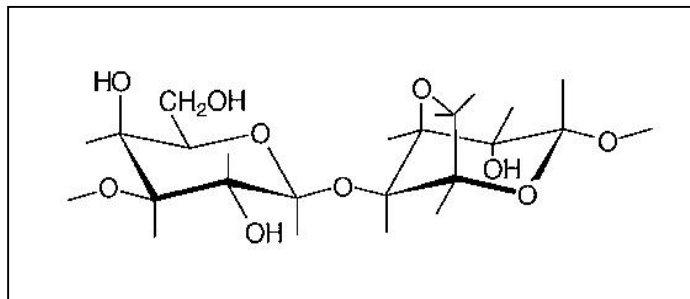


Abbildung 1-7: Formel der Agarose aus [2].

Zur Herstellung dieser Gele wird die Agarose in Wasser oder eine Pufferlösung suspendiert und durch Aufkochen gelöst. Beim Abkühlen geliert sie und bildet aus den Polysaccharidketten Doppelhelices, die sich zu relativ dicken Fäden zusammenlagern und vernetzen (Abbildung 1-8). Diese Struktur verleiht den Agarosegelen eine hohe Stabilität bei relativ großen Porendurchmessern. Daher üben diese Gele nur auf sehr große Moleküle einen Siebeffekt aus, wodurch sie besonders gut zur Elektrophorese von Nukleinsäuren und großen Proteinen mit sehr hohen Molekulargewichten geeignet sind. Auf Proteine, die ein Molekulargewicht unter 100 kDa besitzen, üben die Agarosegele nahezu keine Siebwirkung mehr aus. Die Porengröße hängt von der Gesamtagarosekonzentration ab.

Der Vorteil der Agarosegele liegt darin, dass sie chemisch inert, aber nicht toxisch sind. Allerdings sind sie nicht elektroosmosefrei, und sie zeigen bei empfindlichen Färbeverfahren eine relativ hohe Hintergrundfärbung, die in einer hohen Nachweisgrenze resultiert.

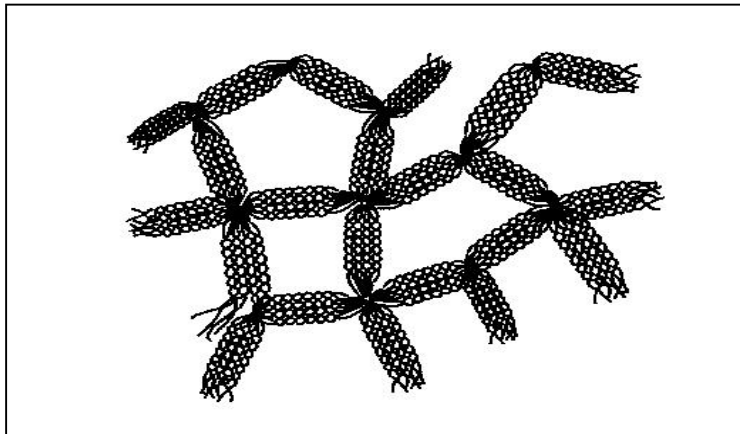


Abbildung 1-8: Struktur des Agarosegels aus [2].

Polyacrylamidgele sind die am häufigsten in der Proteinanalytik eingesetzten elektrophoretischen Träger, da sie gegenüber anderen Trägern entscheidende Vorteile bieten. Sie gehen keine Wechselwirkungen mit den zu trennenden Substanzen ein, da sie chemisch inert sind und keine elektrischen Ladungen tragen, die eine Elektroendosmose verursachen könnten. Weiterhin bieten die Polyacrylamidgele eine gute Siebwirkung und ermöglichen so einen zusätzlichen Trenneffekt über ihre Porengröße, die sich exakt und reproduzierbar einstellen lässt. Die Detektion der getrennten Stoffe kann direkt im Polyacrylamidgel mit Hilfe von zahlreichen Färbemethoden erfolgen (vgl. Kapitel 3.2). Außerdem können die Gele nach erfolgter Elektrophorese sehr leicht nach Trocknung für längere Zeit aufbewahrt werden. Als großer Nachteil der Polyacrylamidgele ist die hohe Toxizität (Haut und Nervengift) der Acrylamidmonomere zu nennen. Nach vollständiger Auspolymerisation ist das Gel allerdings gesundheitlich unbedenklich. Weiterhin ist zu bedenken, dass die Porengröße der Gele einen limitierenden Faktor darstellt. Proteine, die größer als 800 kDa sind, können in das Gel nicht mehr hineinwandern.

Durch radikalische Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit dem Quervernetzer *N,N'*-Methylenbisacrylamid (BIS, Bisacrylamid) erhält man ein klares, sehr stabiles Gel. Die Porengröße wird durch die Gesamtacrylamidkonzentration *T* (engl.: total acrylamid concentration) und den Vernetzungsgrad *C* (engl.: cross-linking agent) genau definiert und lässt sich reproduzierbar herstellen:

$$T [\%] = \frac{a + b}{V} \cdot 100 \quad (\text{Gleichung 18})$$

$$C [\%] = \frac{b}{a + b} \cdot 100 \quad (\text{Gleichung 19})$$

a: Masse des Acrylamids [g]

b: Masse des Quervernetzers (z.B. *N,N'*-Methylenbisacrylamid) [g]

V: Volumen der Lösung [ml]

Die Porengröße ist festgelegt durch das Verhältnis der Acrylamidgesamtmenge pro Volumeneinheit (Gleichung 18) und der Menge des eingesetzten Quervernetzers (Gleichung 19). Durch Variation der Konzentrationen kann der mittlere Porenradius an die Größe der zu trennenden Proteine angepasst und hierdurch ihr Auflösungsvermögen optimiert werden. Bei konstantem T ist die Porengröße eine biphasische Funktion von C, die bei Konzentration von 5% ein Minimum erreicht. Niedrigere und höhere C-Werte führen zu größeren Poren [1].

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wird die Mischung aus Acrylamidmonomeren und dem Quervernetzer mit einem Katalysator-Initiator-System versetzt, das über eine radikalische Polymerisation die Gelbildung katalysiert. Die Kombination aus APS (Ammoniumpersulfat) als Radikalstarter und TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin) als Polymerisationskatalysator hat sich als optimales System bewährt. Die Polymerisation selbst verläuft über zwei Schritte: als erstes verbinden sich die Vinylgruppen des Acrylamids zu linearen Polymerketten, anschließend erfolgt dann eine Quervernetzung dieser Polymerketten über das Bisacrylamid (Abbildung 1-9). Auf diese Weise entsteht die räumliche Struktur des Polyacrylamidgeles, die mit der Struktur eines Schwammes vergleichbar ist.

Die Viskosität, Elastizität und Festigkeit eines Polyacrylamidgeles hängt von dem Verhältnis zwischen der Länge der Polyacrylamidketten und der Häufigkeit ihrer Quervernetzung ab. Besteht das Gel aus sehr langen Polyacrylamidketten, erhält man ein elastisches, weiches und klares Gel, während kurze Polyacrylamidketten zu einem zerbrechlichen, spröden und trüben Gel führen.

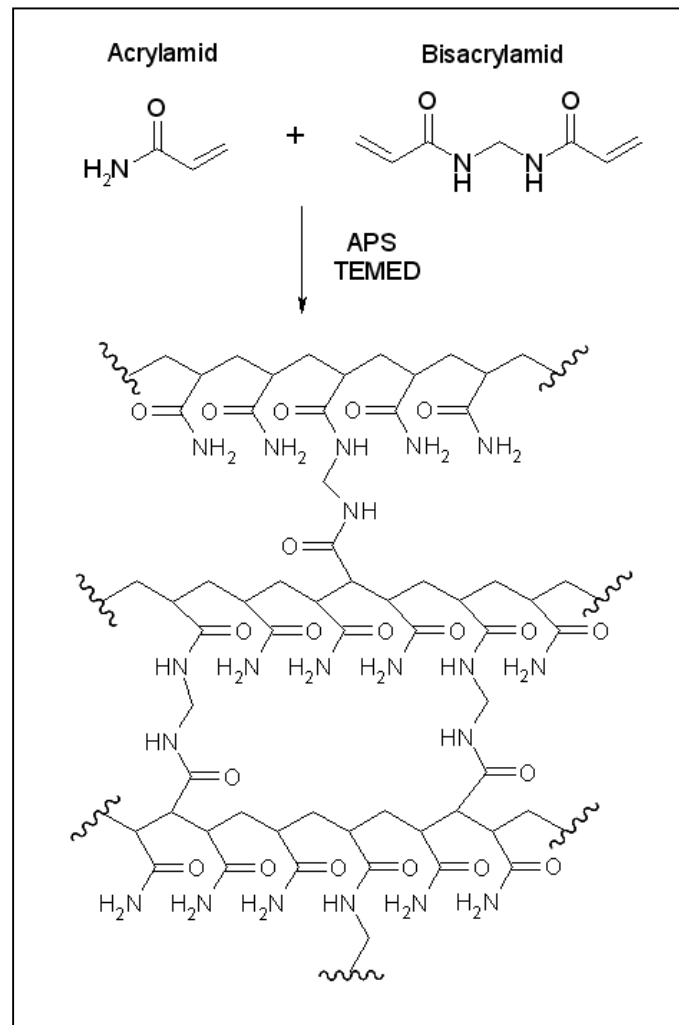


Abbildung 1-9: Schematische Polymerisationsreaktion zwischen Acrylamid und Methylenbisacrylamid.

Es kommen sowohl lineare Gele (homogene Gele), als auch Gradientengele zum Einsatz. Homogene Gele werden aus einer Lösung hergestellt, die die Acrylamid-Monomere sowie den Quervernetzer in konstanter Konzentration enthalten, so dass die resultierenden Gele die gleiche durchschnittliche Porengröße im gesamten Gel aufweisen. Die Herstellung eines Gradientengeles erfolgt mit Hilfe eines Zweikammer-Gradientenmischers. Durch Mischen zweier unterschiedlich konzentrierter Acrylamidlösungen entstehen Gele, bei denen die Porengröße in Laufrichtung abnimmt. In solchen Gradientengelen wandern die Substanzen so lange, bis sie aufgrund ihrer Größe im Gel „stecken bleiben“, was häufig zu einer Verbesserung der Trenneigenschaften führt.

1.1.3 Trenntechniken

Wie eingangs schon erläutert, gibt es sehr viele Kriterien, mit denen die elektrophoretischen Trennverfahren klassifiziert werden können. Im Folgenden werden einige spezielle Trennprinzipien der Gelelektrophorese genauer beschrieben, die für die Arbeit von Bedeutung waren.

1.1.3.1 Diskontinuierliche Elektrophorese (Disk-Elektrophorese)

Beim Eintritt der gelösten Proteine in ein engporiges Gel kann es unter Umständen zur Aggregation und Präzipitation der Proteine kommen. Dies kann mit Hilfe der diskontinuierlichen Elektrophorese (Disk-Elektrophorese) verhindert werden. Die Diskontinuität bezieht sich auf vier Parameter, die die Proteine während der Elektrophorese überwinden müssen: (i) Gelstruktur, (ii) pH-Werte, (iii) Konzentration und (iv) Zusammensetzung der verwendeten Puffersysteme. Die in der Disk-Elektrophorese eingesetzte Gelmatrix besteht aus zwei übereinandergeschichteten, unterschiedlich stark vernetzten Acrylamidgelen: einem weitporigen Sammelgel und einem engporigen Trenngel. Für die Trennung kommt eine Kombination verschiedener Puffer (Elektroden- und Gelpuffer) zum Einsatz. Das Tris-Chlorid/Tris-Glycin-Puffersystem, von Ornstein [10] und Davis [11] entwickelt, ist das am häufigsten verwendete Puffersystem und wird daher hier exemplarisch zur Erläuterung des Prinzips der Disk-Elektrophorese verwendet (Abbildung 1-10).

Das engporige Trenngel enthält einen 0,375 molaren Tris-HCl Puffer pH 8,8, das weitporige Sammelgel einen 0,125 molaren Tris-HCl Puffer pH 6,8. Der pH-Wert des Sammelgels liegt somit sehr nahe am isoelektrischen Punkt des Glycins (pI 6,0), welches im Elektrodenpuffer enthalten ist. Dadurch wird das Glycin schwach negativ geladen und besitzt zu Beginn der Elektrophorese eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit als das Chlorid-Ion des Gelpuffers. Daher werden die Chlorid-Ionen auch als Leit-Ionen und die Glycin-Ionen als Folge-Ionen bezeichnet. Die Mobilität der Proteine aus der aufgetragenen Probelösung liegt zwischen der der Leit- und Folge-Ionen. Beim Anlegen einer elektrischen Spannung werden dann alle Proteine bzw. Ionen im Sammelgel, aufgrund der Diskontinuität des elektrischen

Feldes, nach dem Prinzip der Isotachophorese getrennt, d.h. alle Ionen bewegen sich mit der gleichen Geschwindigkeit. Im Bereich der Ionen mit hoher Mobilität (Leit-Ionen) stellt sich eine niedrigere Feldstärke ein als im Bereich der Ionen mit geringer Mobilität (Folge-Ionen). Die zu trennenden Proteine befinden sich daher in einem Feldstärkegradienten. Dies führt dazu, dass sich die Proteine während der Elektrophorese in der Reihenfolge ihrer Mobilität zwischen dem schnell wandernden Leit-Ion Chlorid und dem langsam wandernden Folge-Ion Glycin ausrichten. Proteine mit einer hohen Mobilität folgen unmittelbar dem Leit-Ion, die mit einer niedrigen Mobilität wandern direkt vor dem Folge-Ion. Auf diese Weise bildet sich ein Proteinstapel bestehend aus sehr scharfen Proteinbanden. Dieser Konzentrationseffekt wird auch als Stapel-Effekt oder Stacking-Effekt bezeichnet. Aufgrund des Feldstärkegradienten wird die Wanderungsgeschwindigkeit der zu trennenden Proteine reguliert. Wandert eine Komponente in den Bereich höherer Mobilität, so sorgt die niedrigere Feldstärke in diesem Bereich dafür, dass das Teilchen gebremst wird und wieder zurückfällt. Wandert die Komponente jedoch zu langsam, wird sie durch die höhere Feldstärke in diesem Bereich wieder nach vorne beschleunigt.

Der Proteinstapel wandert relativ langsam mit konstanter Geschwindigkeit bis an die Grenzfläche des engporigen Trenngels. Beim Auftreffen auf das Trenngel wird der Proteinstapel einem plötzlichen hohen Reibungswiderstand ausgesetzt, wodurch die Proteine gebremst werden, was zu einer zusätzlichen Zonenverschärfung führt. Das niedermolekulare Glycin kann ungehindert ins Trenngel hineinwandern und überholt die Proteine. Im Trenngel befinden sich die Proteine nun in einem homogenen Puffersystem mit einem höheren pH-Wert, wodurch die Proteine zusätzlich eine höhere Nettoladung erhalten. Als Folge orientieren sich die Proteine nun neu und werden nach dem Prinzip der Zonenelektrophorese getrennt. Neben der Ladung hat im engporigen Trenngel die Molekülgröße der Proteine einen erheblichen Einfluss auf ihre Mobilität und somit auf ihre Trennung. Im Gegensatz zur Trennung im weitporigen Sammelgel hängt die Mobilität und somit die Trennung der Proteine in diesem engporigen Trenngel hauptsächlich von der Molekülgröße ab. Die Proteine wandern nun in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, wodurch sich die Reihenfolge verändern kann, in der sie das Trenngel passieren (vgl. Abbildung 1-10).

Durch den Stapeleffekt im Sammelgel wandern die Proteine sehr langsam in die Gelmatrix und aggregieren damit im Idealfall nicht mehr. Diese Vortrennung und Aufkonzentrierung der Zonen sorgt dafür, dass man mit der Disk-Elektrophorese eine sehr hohe Bandenschärfe und Auflösung erhält.

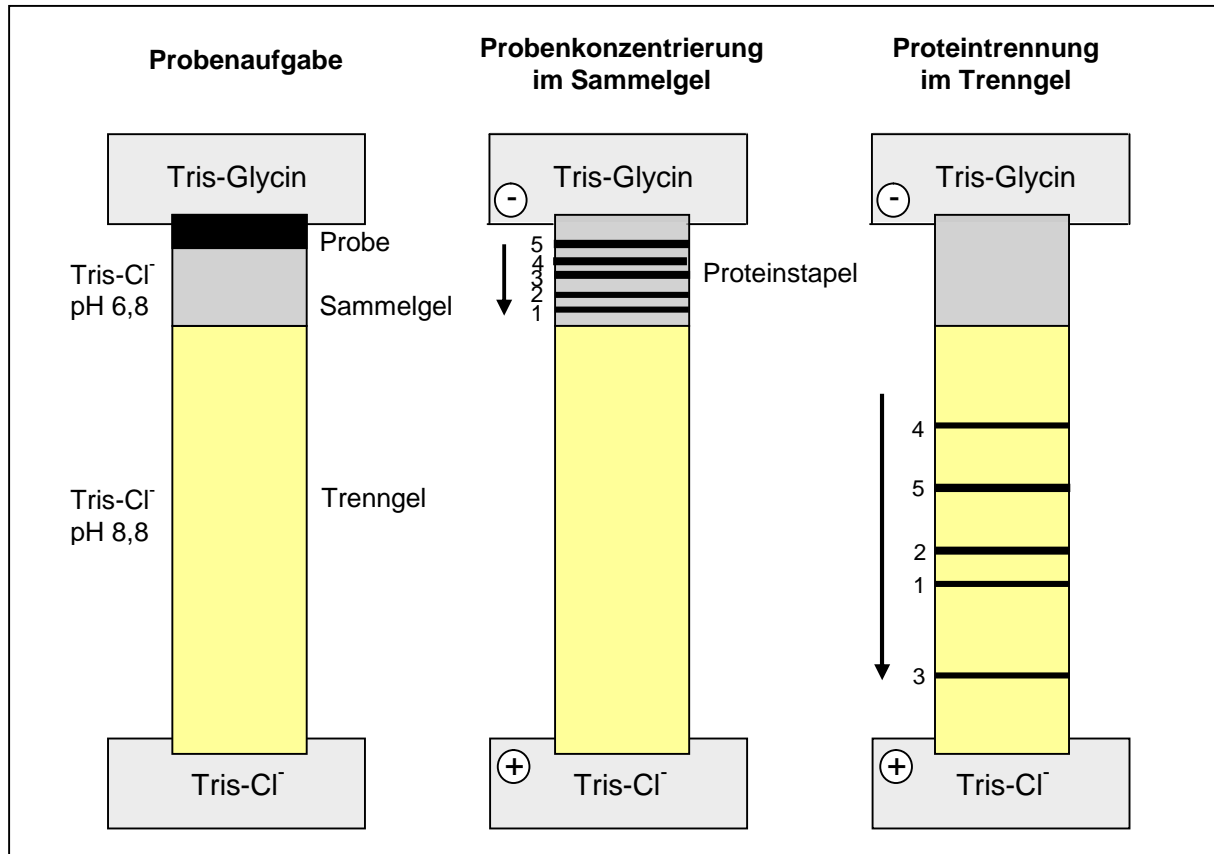


Abbildung 1-10: Prinzip der diskontinuierlichen Elektrophorese (Disk-Elektrophorese).

Die Mobilität der Teilchen in engporigen Gelen ist sehr viel stärker abhängig von ihrem Moleküldurchmesser als in weitporigen Gelen. Den Zusammenhang zwischen Mobilität und Molekülgröße der Proteine lässt sich mit Hilfe der Zonenelektrophorese ermitteln und anschließend graphisch darstellen. Werden Proteine unter identischen elektrophoretischen Bedingungen (identischen Puffer-, Temperatur-, Zeit- und elektrischer Feldstärkebedingungen), jedoch in Gelen unterschiedlicher Konzentration getrennt, so legen diese unterschiedliche Laufstrecken in den verschiedenen Gelen zurück. Über diese Laufstrecken lässt sich dann die relative Mobilität μ_r des Proteins in jedem Gel bestimmen. Die relative Mobilität μ_r berechnet

sich aus dem Quotienten der Wanderungsstrecke einer Bande und der wandernden Lauffront. Trägt man die μ_r -Werte eines Proteins logarithmisch über die Gelkonzentrationen auf, so ergibt sich eine Gerade, die als Ferguson-Plot bekannt ist und sich nach Gleichung 20 berechnen lässt.

$$\log \mu_r = - K_R \cdot T \quad (\text{Gleichung 20})$$

μ_r : relative Mobilität des Proteins

K_R : Retardationskoeffizient

T: Gesamtacrylamidkonzentration (total acrylamid concentration)

Die Steigung der Geraden ist ein Maß für die Molekülgröße und ist definiert als Retardationskoeffizient K_R . Somit können die Molekülgrößen der Proteine aus der Steigung der Geraden berechnet werden. Bei Proteingemischen lassen sich aufgrund der Lage der Proteingeraden folgende Aussagen machen [2]:

- (i) Parallele Geraden treten bei Proteinen mit identischer Größe, aber unterschiedlichen Nettoladungen auf, z.B. bei Isoenzymen, z.B. LDH₁ und LDH₂: Lactatdehydrogenase-Isoenzyme, die gleiche Massen, aber unterschiedliche Ladungen besitzen (Abbildung 1-11 A).
- (ii) Schneiden sich mehrere Geraden in einem Punkt, liegen verschiedene Polymere eines Proteins mit gleicher Nettoladung, aber unterschiedlichen Molekülgrößen vor (Abbildung 1-11 B).
- (iii) Schneiden sich Geraden mit unterschiedlicher Steigung nicht, ist das Protein der oberen Gerade kleiner und stärker geladen als das andere (Abbildung 1-11 C).
- (iv) Kreuzen sich die Geraden im Bereich über T = 2%, ist das Protein welches die y-Achse weiter oben schneidet, größer und stärker geladen als das andere (Abbildung 1-11 D).

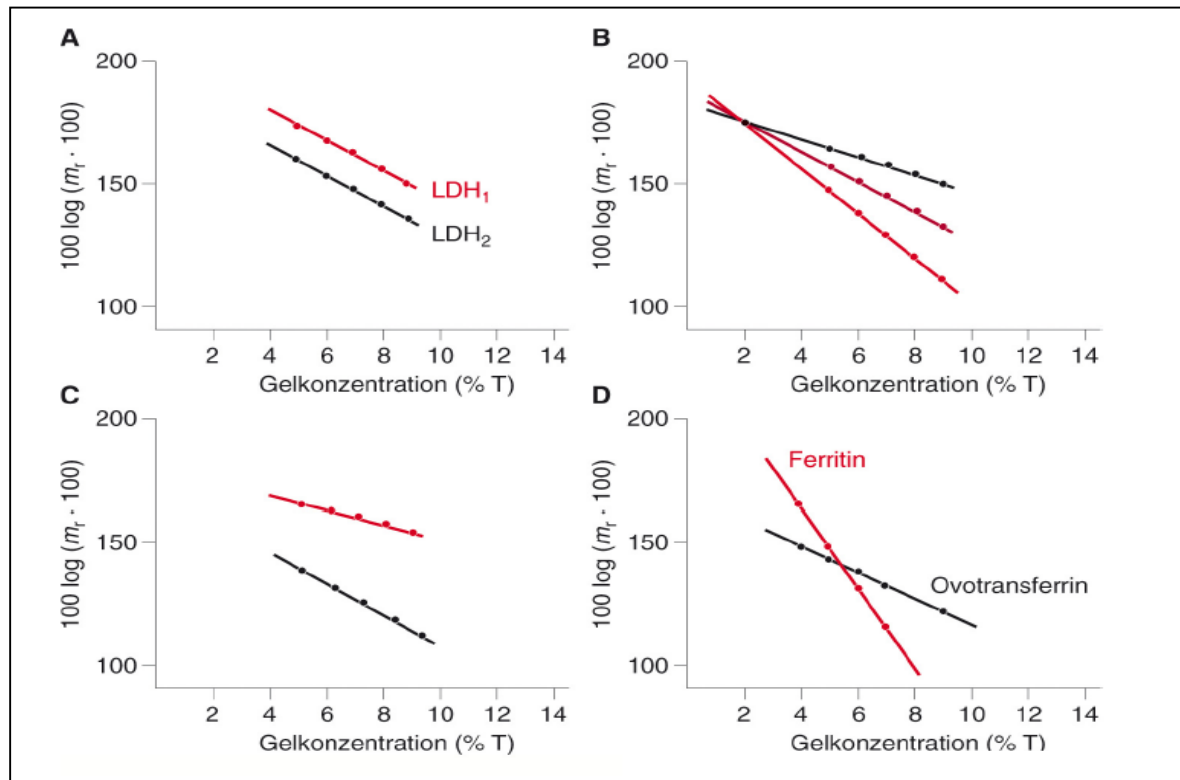


Abbildung 1-11: Ferguson-Plot aus [2]: Darstellung der elektrophoretischen Mobilität der Proteine als Funktion der Polyacrylamid-Konzentration T.

1.1.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde im Jahre 1967 von Shapiro und Mitarbeitern entwickelt [12] und ist heute die Standardmethode in der Proteinanalytik. SDS (Abkürzung für sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, welches dem Probenpuffer im Überschuss zugesetzt wird. Beim Kontakt der SDS-Ionen mit dem Protein richten sich diese zu Micellen aus, so dass ein SDS-Protein-Komplex entsteht. Die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten lagern sich an die hydrophoben Proteindomänen an, die hydrophilen Sulfatgruppen treten mit dem umgebenden Hydratwasser in Wechselwirkung. Dadurch werden Wasserstoffbrücken sowie hydrophobe Wechselwirkungen im Protein aufgelöst, wodurch die Quartärstruktur des Proteins weitestgehend in denaturierte Untereinheiten aufgespaltet wird. Den Puffern werden zusätzlich reduzierende Thiolverbindungen, wie z.B. β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), zugesetzt, die Schwefelbrücken zwischen Cysteinresten aufspalten. Die kationischen Gruppen

der Proteine treten mit den Sulfatgruppen des SDS in Wechselwirkung und werden dadurch abgeschirmt. Unter dem Einfluss des SDS werden die einzelnen Polypeptidketten zu stabförmigen oder, bei Proteinen mit kleinen Massen, zu kugelförmigen SDS-Protein-Komplexen umgewandelt, die eine negative Gesamtladung tragen und somit sich nur in anodische Richtung bewegen.

SDS reagiert mit einer Vielzahl von Proteinen in gleicher Weise. Das Detergenz wird so angelagert, dass pro Gramm Protein 1,4 g SDS gebunden werden. Alle Proteine enthalten so ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis. Weiterhin nehmen die denaturierten Proteine alle eine ähnliche Konformation an, so dass ihre Wanderungsgeschwindigkeit im Gel und somit ihre Trennung primär von ihrer Größe abhängt. Im Vergleich von SDS denaturierter Proteine bekannter Größe können so Rückschlüsse auf das Molekulargewicht von denaturierten Proteinen bzw. Proteinuntereinheiten unbekannter Größe gezogen werden.

Mit dieser Technik können auch sehr hydrophobe und denaturierte Proteine in Lösung gebracht und aufgetrennt werden. Einen weiteren Vorteil stellt die relative hohe negative Oberflächenladung der SDS-Protein-Komplexe dar, durch die zum einen eine sehr schnelle Trennung erreicht wird, und zum anderen eine Proteinaggregation während der gesamten Elektrophorese verhindert wird. Als Nachteil ist zu nennen, dass SDS mit einigen nichtionischen Detergenzien, die zur Solubilisierung hydrophober Membranproteine eingesetzt werden, nicht kompatibel ist. Stark saure Proteine binden kein SDS. Diese Proteine können aber alternativ mit kationischen Detergenzien aufgetrennt werden. Auch die Analyse von Glykoproteinen mittels SDS-PAGE ist mit Schwierigkeiten verbunden. Der Zuckeranteil kann kein SDS binden. Somit ist das Glykoprotein nicht so stark mit SDS beladen wie nicht glykolisierte Proteine und wandert daher langsamer. Die Verwendung eines Tris-Borat-EDTA-Puffers sorgt dafür, dass sich die Borat-Ionen an dem Zuckerteil anlagern, diesen negativ laden und somit die Wanderungsgeschwindigkeit erhöhen.

1.1.3.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) ist ein elektrophoretisches Verfahren, bei dem die zu trennenden Teilchen innerhalb eines pH-Gradienten unter dem Einfluss des elektrischen Feldes wandern. Bei dieser Technik erfolgt die Trennung der Teilchen aufgrund ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte (pI). Sie ist daher nur auf amphotere Moleküle wie Proteine und Peptide anwendbar.

Die Nettoladung eines Amphoters setzt sich aus der Summe aller positiven und aller negativen Ladungen der Säure- und Aminogruppen zusammen. Phosphorylierungen und Glykosilierungen beeinflussen die Ladung der Moleküle zusätzlich. Der isoelektrische Punkt ist somit eine charakteristische Größe für jedes Protein.

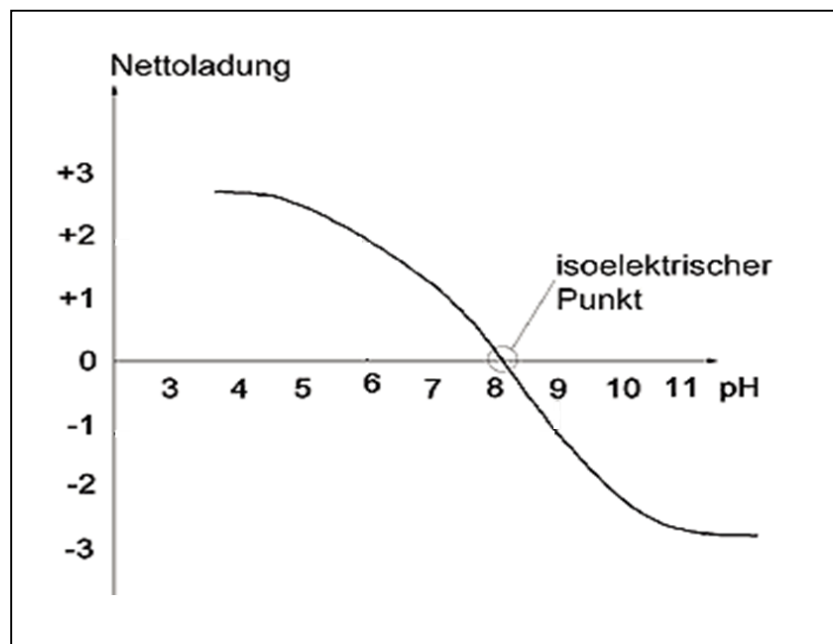


Abbildung 1-12: Nettoladungskurve: Änderung der Nettoladung eines Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert. Bei pH 8, dem isoelektrischen Punkt (pI) dieses Proteins, beträgt die Nettoladung Null, und dieses Proteine ist fokussiert.

Entsprechend ihrer Nettoladung wandern die Proteine zur Kathode oder zur Anode. Aufgrund des pH-Gradienten verändert sich jedoch die effektive Gesamtladung des Amphoters während der IEF. Ein Protein mit z.B. einer positiven Nettoladung wandert zur Kathode, wobei es bei steigendem pH-Wert des pH-Gradienten durch

Deprotonierung langsam seine Ladung verliert. Dadurch verlangsamt das Protein seine Geschwindigkeit, bis es den pH-Wert im Gradienten erreicht, an dem sich seine positiven und negativen Ladungen ausgleichen und somit seine Nettoladung gleich Null ist (Abbildung 1-12). Dieser pH-Wert entspricht dem isoelektrischen Punkt des Proteins. Da die Proteine nun keine Ladung mehr aufweisen, können sie nicht weiter wandern und verharren somit an diesem Punkt im Gel. Das Prinzip der IEF veranschaulicht Abbildung 1-13.

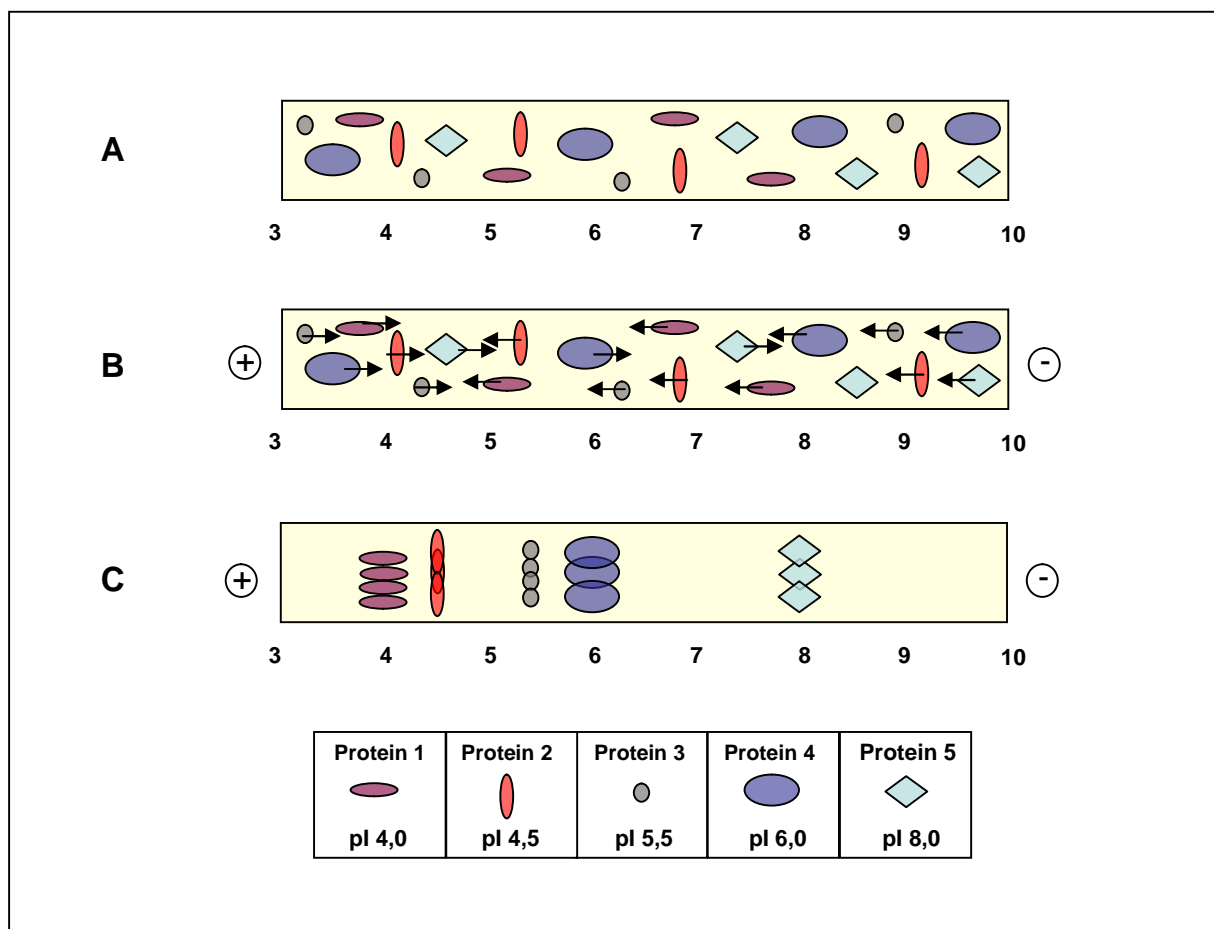


Abbildung 1-13: Prinzip der isoelektrischen Fokussierung. **A** Auftrag der Probe bestehend aus fünf verschiedenen Proteinen mit unterschiedlichen pI. **B** Durch Anlegen des elektrischen Feldes wandern die Proteine zu dem Punkt im Gel, an dem der pH-Wert ihrem pI entspricht. **C** Die Proteine sind getrennt, sie befinden sich an ihrem pI und werden an diesem durch das elektrische Feld fokussiert.

Im Gegensatz zu anderen elektrophoretischen Verfahren ist die Wanderungsstrecke der Moleküle bei der IEF von der Zeit unabhängig. Die IEF ist eine

Endpunktmethode, bei der ein zusätzlicher Fokussierungseffekt, der der Diffusion im Gel entgegenwirkt, dafür sorgt, dass die getrennten Proteine an ihren isoelektrischen Punkten im Gel verbleiben. Sollte ein Protein aus dem Bereich seines pI wieder herausdiffundieren, erhält es sofort wieder eine Ladung und wird unter dem Einfluss des elektrischen Feldes dazu gezwungen, zu seinem pI zurückzuwandern. Die IEF stellt somit eine selbst korrigierende Trennung dar, indem sich ein Gleichgewicht zwischen dem elektrischen Massentransport und der Diffusion einstellt.

Ein stabiler und kontinuierlicher pH-Gradient mit gleichmäßiger und konstanter Leitfähigkeit sowie Pufferkapazität ist Grundbedingung zur Erzielung hochauflösender und reproduzierbarer Trennergebnisse. Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten, einen pH-Gradienten, der diese Anforderungen erfüllt, für die IEF aufzubauen: (i) durch Verwendung freier Ampholyte (Trägerampholyte) oder (ii) durch die Verwendung immobilisierter Ampholyte (Immobiline), die bereits nach dem Giessvorgang Bestandteil des Gels sind. Bei den Trägerampholyten handelt es sich um ein Gemisch niedermolekularer (600-900 Dalton) aliphatischer Oligoamino- und Oligocarbonsäuren mit unterschiedlichen, aber eng benachbarten isoelektrischen Punkten. Die Trägerampholyte müssen an ihrem pI eine hohe Pufferkapazität, gute Löslichkeit sowie gute Leitfähigkeit besitzen [13]. Durch Anlegen einer Spannung wandern die Trägerampholyte entsprechend ihrer Ladung im elektrischen Feld und bauen so den pH-Gradienten auf. Die Ampholyte mit dem niedrigsten pI wandern bis zur Anode, die mit dem höchsten pI bis zur Kathode. Dadurch wird die anodische Seite des Gels saurer und die kathodische Seite basischer. Die übrigen Ampholyte ordnen sich entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte zwischen den Extremen an und bestimmen so den pH-Wert ihrer Umgebung.

Im Gegensatz zu den Trägerampholyten werden die immobilisierten Ampholyte zur Ausbildung des pH-Gradienten direkt in die Gelmatrix einpolymerisiert [14]. Diese sogenannten Immobiline sind Acrylamidderivate, die zusätzlich eine Amino- oder Carboxylgruppe tragen und somit schwache Säuren bzw. schwache Basen mit definierten pK -Werten darstellen. Die allgemeine Formel der Immobiline lautet $CH_2=CHCO-NH-R$, wobei R entweder die Carboxyl- oder die tertiäre Aminogruppe enthält. Um einen bestimmten pH-Wert einzustellen, müssen zwei verschiedene Immobiline, eine Säure und eine Base, miteinander gemischt werden. Der pH-Wert

im Gel ergibt sich aus dem Verhältnis der einpolymerisierten sauren und basischen Immobiline. In Abbildung 1-14 ist schematisch ein Polyacrylamidnetzwerk mit einpolymerisierten Immobilen dargestellt. Diese immobilisierten pH-Gradienten (IPGs) können beliebig allen Trennproblemen angepasst werden. Es können sehr enge pH-Gradienten aufgebaut werden, mit denen man eine sehr hohe Auflösung erreicht. Aber auch die Ausbildung sehr weiter, linearer und nicht-linearer Gradienten ist möglich. Die Herstellung solcher IPGs ist zwar sehr aufwendig. Durch ihre Verwendung kann jedoch eine erhöhte Reproduzierbarkeit des Proteinmusters erzielt werden, da der Gradient fest an die Gelmatrix gebunden ist und sich somit während der gesamten IEF nicht verändern kann.

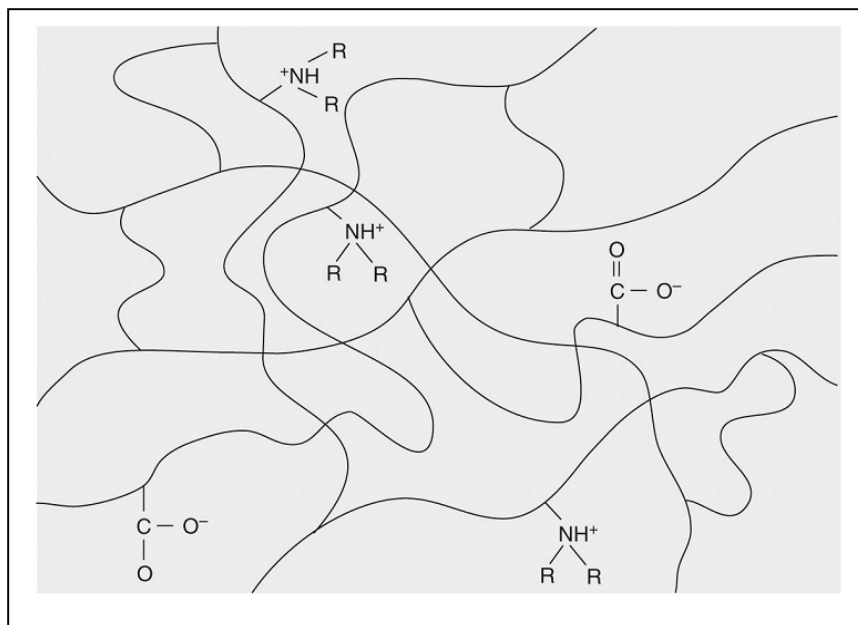


Abbildung 1-14: Schematisches Polyacrylamidnetzwerk mit einpolymerisierten Immobilen; aus [2].

Das Auflösungsvermögen ΔpI der IEF ist das Minimum der pH-Differenz, die nötig ist, um zwei benachbarte Banden aufzulösen und wird folgendermaßen definiert:

$$\Delta pI = \sqrt{\frac{D \cdot \frac{d pH}{d x}}{-E \cdot \frac{d \mu}{d pH}}} \quad (\text{Gleichung 21})$$

ΔpI : Auflösungsvermögen

D: Diffusionskoeffizient des Ampholyten

$\frac{d \text{pH}}{d x}$: Anstieg des pH-Gradienten

E: elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]

$\frac{d \mu}{d \text{pH}}$: Beweglichkeitsänderung des Ampholyten im pH-Gradienten

Aus Gleichung 21 geht hervor, dass die Auflösung umso größer wird, also ΔpI umso kleiner, je enger der pH-Gradient der Trennstrecke gewählt wird. Innerhalb gewisser Grenzen kann durch Anlegen einer höheren Spannung die Feldstärke und schließlich die Auflösung erhöht werden. Die Mobilität des Proteins am pI kann allerdings nicht verändert werden. Um eine Trennung zu erreichen, sollte die Differenz zwischen den pI-Werten der zu trennenden Stoffe mindestens 0,02 pH-Einheiten betragen [15].

1.1.3.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)

Lange Zeit waren eindimensionale Trenntechniken wie Disk- und SDS-Elektrophorese sowie die IEF die einzigen Techniken zur Trennung und Charakterisierung von Proteinen. Diese Methoden können allerdings im günstigsten Fall nur 50-100 Proteine auftrennen. Für die Analyse komplexer Proteingemische bestehend aus vielen hundert Proteinen, wie sie in ganzen Zellen oder Geweben vorkommen, sind sie ungeeignet. In den 1970er Jahren entwickelten O'Farrell [16] und Klose [17] unabhängig voneinander die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE), die die Proteine aufgrund zwei unterschiedlicher Eigenschaften in zwei aufeinander folgenden Dimensionen auftrennt. In der ersten Dimension erfolgt eine IEF, also Auftrennung nach unterschiedlichen isoelektrischen Punkten, in der zweiten Dimension, senkrecht zur ersten Dimension, schließt sich eine SDS-PAGE an, die die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte auftrennt. Schon vor dieser Zeit wurden zweidimensionale Techniken [18, 19] eingesetzt, die unter nativen Bedingungen durchgeführt wurden. Erst durch die Einführung von komplett denaturierten Bedingungen im Jahre 1975 durch O'Farrell gelang es, ganze Zellinhalte in tausende Proteinspots aufzutrennen. Seitdem hat sich das Grundprinzip der 2-DE Technik nicht verändert und gilt auch heute noch als die

Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen für die Analyse komplexer Proteingemische.

Die 2-DE ist eine sehr komplexe und zeitaufwendige Methode, deren Durchführung sich in sehr viele Arbeitsschritte gliedert. Grundvoraussetzung für die 2-DE ist eine sorgfältige Probenvorbereitung, durch die gewährleistet werden muss, dass die Proteine während der gesamten Elektrophorese optimal in Lösung bleiben. Im Idealfall liegen die Proteine disaggregiert, denaturiert, reduziert und somit komplett gelöst vor. Mit Hilfe von nichtgeladenen Chaotropen wie Harnstoff und zwitterionischen Detergenzien (z.B. CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonat)) werden die Proteine denaturiert und in Lösung gebracht. Mit einer Mischung aus Harnstoff und Thioharnstoff können sogar sehr hydrophobe Proteine solubilisiert werden. Zusätzlich werden der Probelösung meist noch Trägerampholyte hinzugefügt, die die Löslichkeit der Proteine verbessern, indem sie die Proteinaggregation aufgrund von Ladungswechselwirkungen minimieren.

Nach erfolgreicher Solubilisierung der Proteine werden diese in der ersten Dimension mittels IEF getrennt. In der ursprünglichen Technik wurde die IEF in individuellen Rundgelen in Röhrchen mit aus Trägerampholyten gebildeten pH-Gradienten durchgeführt. Diese Technik wurde inzwischen vollständig von der IEF in foliengestützten IPG-Streifen [14, 20] abgelöst (immobilisierte pH-Gradienten, vgl. Kap. 1.1.3.3, IEF). Damit ist die Methode leichter handhabbar und robuster geworden, so dass sie in jedem Proteinlabor ohne große Schwierigkeiten durchgeführt werden kann. Die IPG-Streifen bestehen aus getrockneten Gelen, die vor der IEF vollständig aufquellen müssen, um eine optimale Trennung zu erzielen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Proteinprobe auf die IPG-Streifen aufzutragen. Die Probe kann entweder über den gesamten Bereich oder als schmale Zone aufgegeben werden. Bei der Rehydratisierungsbeladung erfolgen die Quellung und die Beladung des Streifens in einem Schritt. Die Proteinprobe wird dabei über das gesamte getrocknete Gel verteilt, so dass die Proteine im elektrischen Feld aus verschiedenen Richtungen an ihren isoelektrischen Punkt wandern. Bei der Beladung mit Hilfe eines Probenaufgabetrichters oder einer Papierbrücke muss die Quellung vor dem Probenauftrag erfolgen. Bei diesen Techniken wird die Probe an

einem definierten pH-Wert aufgetragen, an dem es zu einer Aufkonzentrierung der Probe kommt. Als Folge werden häufig Proteinaggregation und -präzipitation an dieser Probenaufgabestelle beobachtet.

Bevor die Proteine nach erfolgter IEF in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE getrennt werden können, muss zunächst noch eine sogenannte Äquilibration stattfinden. Während dieses Äquilibrationsschrittes werden die IPG-Streifen mit SDS gesättigt, um so einen optimalen Transfer der Proteine von der ersten auf die zweite Dimension zu gewährleisten. Zusätzlich werden die fokussierten Proteine in einem ersten Schritt reduziert, d.h. durch den Zusatz von Dithiothreitol (DTT) oder Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken in den Proteinen gespalten. Um eine Reoxidation dieser freien Thiolgruppen zu verhindern, werden diese mit z.B. Jodacetamid in einem zweiten Schritt alkylert.

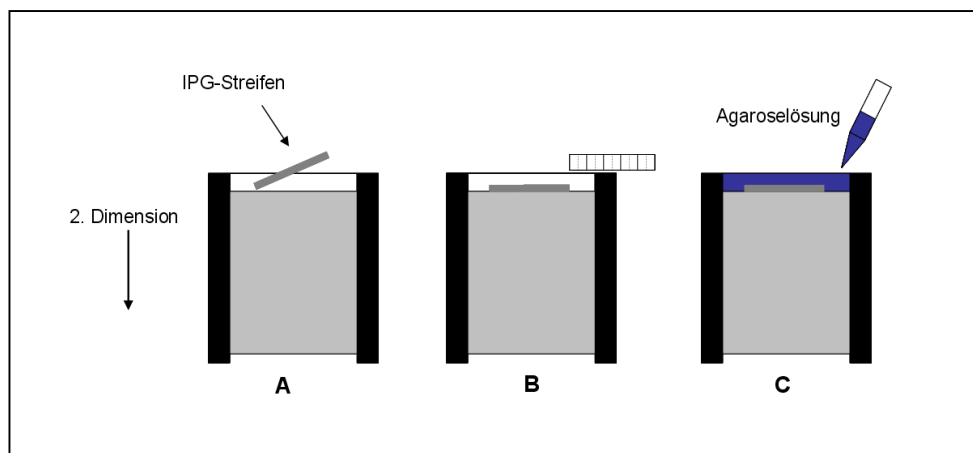


Abbildung 1-15: Aufbringen des IPG-Streifens auf das SDS-Gel. Der IPG-Streifen wird mit einer Agaroselösung auf dem 2D-Gel fixiert.

Für die anschließende Trennung in der zweiten Dimension können sowohl vertikale als auch horizontale SDS-Gele verwendet werden, wobei die äquilibrierten IPG-Streifen bei der horizontalen 2-DE einfach auf die Oberfläche des SDS-Gels gelegt werden. Bei Verwendung von vertikalen SDS-Gele werden die fokussierten IPG-Streifen seitlich auf die Gelkante des SDS-Gels gelegt und mit einer heißen Agaroselösung fixiert (Abbildung 1-15). Nach Anlegen des elektrischen Feldes werden die entfalteten und von SDS umgebenen Proteine aufgrund ihrer

unterschiedlichen Molekülgröße, wie in Kapitel 1.1.3.2 SDS-PAGE beschrieben, getrennt (Abbildung 1-16).

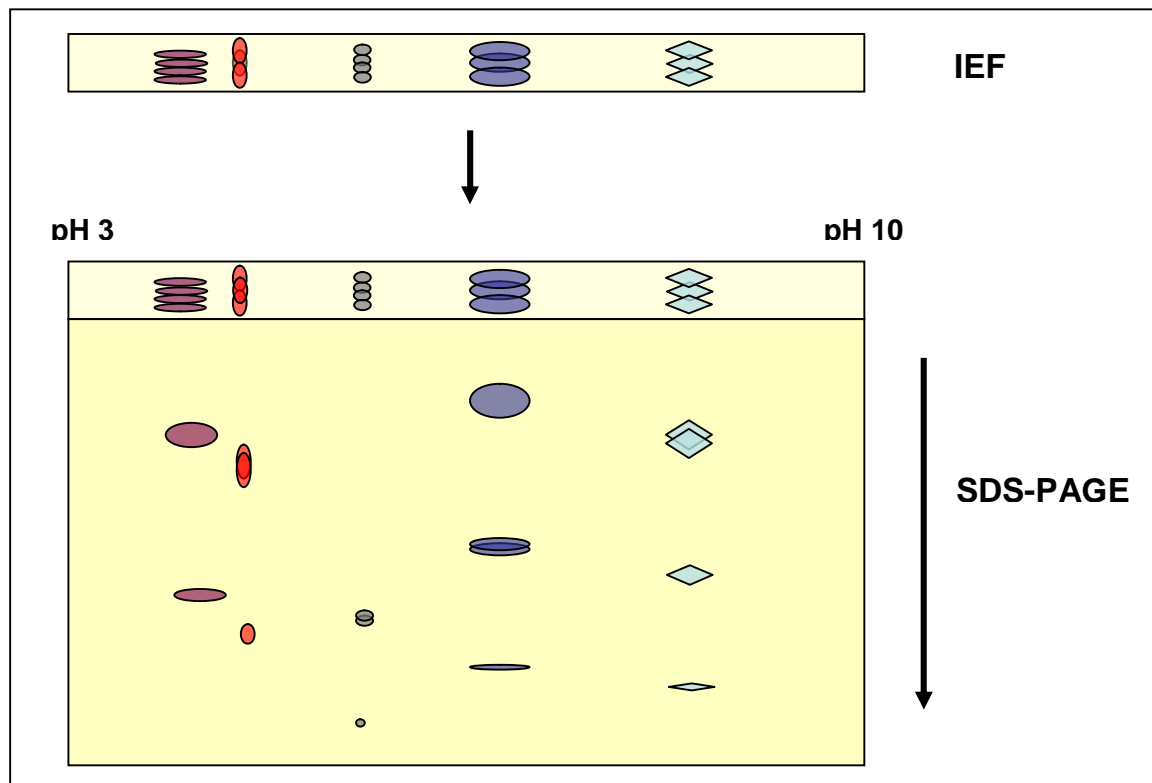


Abbildung 1-16: Schema der 2D Gelelektrophorese.

1.1.4 Anwendung der Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist die meist verbreitete Analysentechnik in der Bioanalytik, insbesondere in der Proteinanalytik. Jeder, der mit Biomolekülen arbeitet, ist mit dieser Technik vertraut. Für lange Zeit war die SDS-PAGE die einzige Analysentechnik zur Trennung von Proteinmolekülen, zur Bestimmung ihrer strukturellen Eigenschaften sowie zur Quantifizierung. Nach Einführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese durch O'Farrel und Klose im Jahre 1975 gewann diese hochauflösende Trenntechnik sehr schnell an Bedeutung in der Reinheitsprüfung und zur Isolierung von Proteinen, und ist bis heute die Methode der Wahl zur Trennung von komplexen Proteinproben [21]. Durch die Kombination der IEF in der ersten Dimension und der SDS-PAGE in der zweiten Dimension können

mehr als 5000 Proteine gleichzeitig in nur einem Gel getrennt werden. Aufgrund dieser hohen Leistungsfähigkeit [2, 22] kommt die 2-DE in vielen Forschungsgebieten zum Einsatz. So findet sie z.B. Anwendung zur Bestimmung von Proteineigenschaften (Identitätsprüfung), in der Qualitätskontrolle (Reinheitsprüfungen), in der klinischen Diagnostik bis hin zur Entwicklung neuer Arzneistoffe [23, 24].

Die in den Proteinmustern enthaltenen Informationen liefern Lösungen biochemischer und medizinischer Fragestellungen. Vergleicht man z.B. die Proteinmuster aus verschiedenen definierten Zellen oder Körperflüssigkeiten (z.B. krank - gesund, verschiedene Stoffwechselzustände), so werden die Veränderungen, die für diesen Zustand charakteristisch sind, im Proteinmuster sichtbar. Da Proteine die prinzipiellen Zielmoleküle (Targets) für Arzneistoffe sind, liefert das Gelbild aufgrund der Proteinveränderung nach einer Arzneistoffgabe auch wichtige Informationen über den Mechanismus, den therapeutischen Erfolg sowie über toxische Nebenwirkungen [22, 24-27].

Ende der 70er Jahre ist Insulin als erstes gentechnisch hergestelltes Protein zu therapeutischen Zwecken auf dem Markt erschienen. Seitdem hat die Anzahl der biotechnologischen Produkte rapide zugenommen [25, 28-30]. Derzeit sind in Deutschland mindestens 134 Arzneimittel mit 99 Wirkstoffen zugelassen, die gentechnisch hergestellt werden [31]. Die wichtigsten Anwendungsgebiete sind gegenwärtig Diabetes (Insuline), Blutarmut (EPO-Präparate), rheumatoide Arthritis (Immunmodulatoren), Krebserkrankungen (Monoklonale Antikörper), und angeborene Stoffwechsel- und Gerinnungsstörungen (Enzyme, Gerinnungsfaktoren) sowie Schutzimpfungen (Gebärmutterhalskrebs, Hepatitis B). Durch die schnelle Entwicklung dieser Biotherapeutika kommt die Gelelektrophorese immer häufiger zur Qualitätskontrolle dieser Produkte zum Einsatz, meist in Kombination mit weiteren, nachgeschalteten Techniken [32]. Die klassische Kombination besteht aus der zweidimensionalen Gelelektrophorese zur Proteintrennung und der nachgeschalteten Massenspektrometrie, mit der im Anschluss die Proteine identifiziert werden können.

Verschiedene gelelektrophoretische Verfahren werden auch in den Arzneibüchern (USP, Ph. Eur.) eingesetzt. SDS-PAGE, IEF und 2-DE werden in den allgemeinen

Monographien „DNA-rekombinationstechnisch hergestellte Produkte“ der Ph. Eur und der USP sowie der Monographie „Allergenzubereitungen“ der Ph. Eur. zur Überprüfung und Validierung des Herstellungsprozesses und zur Qualitätskontrolle der erhaltenen Produkte aufgelistet [1]. Darüber hinaus finden sie Anwendung bei Identitäts- und Reinheitsprüfungen von Protein- und Peptidpharmaka. Dabei werden die elektrophoretischen Techniken teilweise mit anderen Verfahren gekoppelt. So wird zur Identifizierung des Tetracosactids das Untersuchungsmaterial zunächst auf einer Celluloseacetatplatte elektrophoretisch getrennt und die Platte anschließend in der 2. Dimension einer DC unterzogen [1]. Eine Übersicht über die Anwendung elektrophoretischer Trenntechniken in den Arzneistoff-Monographien der Ph. Eur. zeigt Tabelle 1-1.

Tabelle 1-1: Anwendung elektrophoretischer Techniken in Arzneibuchmonographien der Ph. Eur.; aus [1].

Monographie	Prüfung	Technik
Albumin	Identität	Immunoelktrophorese
	Reinheit (Proteinzusammensetzung)	CAF-Elektrophorese
Allergenzubereitungen	Identität	Immunoelktrophorese, SDS-PAGE, IEF
	Reinheit (Proteinprofil, Antigenprofil, Allergenprofil)	
Alteplase	Kontrolle bei der Herstellung	IEF, SDS-PAGE
Antithrombin III	Kontrolle bei der Herstellung	Elektrophorese auf Agarosegel
Blutgerinnungsfaktor VIII	Kontrolle bei der Herstellung	SDS-Agarose-Elektrophorese
Corticotropin	Reinheit (verwandte Proteine)	PAGE
Erythropoetin	Identität	SDS-PAGE
Heparin-Na, -Ca	Identität	Elektrophorese auf Agarosegel
Immunglobulin vom Mensch	Identität	Immunoelktrophorese
	Reinheit (Proteinzusammensetzung)	CAF-Elektrophorese
Immunsere für Menschen	Reinheit (Prüfung auf Albumin)	Gelelektrophorese
Immunsere für Tiere	Reinheit (Prüfung auf Albumin)	Gelelektrophorese
Interferone alpha-2	Identität	IEF, SDS-PAGE
	Reinheit (Verunreinigungen mit abweichender relativer Molmasse)	SDS-PAGE
Interferon gamma 1b	Identität	SDS-PAGE
	Reinheit (Verunreinigungen mit abweichender relativer Molmasse)	SDS-PAGE
Molgramostin	Identität	IEF, SDS-PAGE
	Reinheit (Verunreinigungen mit abweichender relativer Molmasse)	SDS-PAGE
Somatropin	Identität	IEF
	Reinheit (Prüfung auf Isoformen)	IEF
Tetracosactid	Identität	CAF-Elektrophorese (2D mit anschließender DC)

CAF: Celluloseacetatfolien; IEF: Isoelektrische Fokussierung; SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

1.2 Bewertung von Analysenmethoden

Die grundlegende Fragestellung in der Qualitätskontrolle ist, wie zuverlässig eine Analysenmethode ist, mit der die Qualität eines Produktes beurteilt wird. Diese Frage kann durch die Validierung der Analysenmethode beantwortet werden. Ziel der Validierung ist der Nachweis, dass ein Analysenverfahren und alle dafür technischen Ausrüstungsgegenstände zuverlässig innerhalb festgelegter Grenzen arbeiten und entsprechend der analytischen Problemstellung zu den erwarteten Ergebnissen führen.

Zur Methodenvvalidierung in der pharmazeutischen Analytik wurden von der International Conference on Harmonisation (ICH) Richtlinien herausgegeben, auf denen die meisten qualitätssichernden Bestimmungen und Anforderungen der arzneimittelzulassenden Behörden beruhen. In der Qualitätsrichtlinie Q2 (R1) [33] wird die analytische Validierung behandelt. In Anlehnung an diese Guideline wurden die Parameter Präzision, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze zur Bewertung der Leistungsfähigkeit quantitativer Methoden herangezogen.

1.2.1 Präzision

Präzision einer Analysenmethode ist die Übereinstimmung von Messwerten innerhalb einer Messserie. Die Präzision ist ein Maß für den Grad der Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse bei wiederholter Durchführung unter den gleichen Bedingungen. Die Präzision einer Analysenmethode kann als Varianz $\hat{\sigma}^2$ (Gleichung 22), als Standardabweichung $\hat{\sigma}$ (Gleichung 23) oder prozentuale relative Standardabweichung RSD% (Gleichung 24) angegeben werden. Die „Überdachung“ zeigt an, dass es sich um einen aus einer Stichprobe geschätzten Wert und nicht um den wahren Wert aus der Grundgesamtheit handelt. Auf diese Weise ist es sehr leicht möglich, zwischen der Standardabweichung der Stichprobe $\hat{\sigma}$ und der Standardabweichung der Grundgesamtheit σ zu unterscheiden. Die Bestimmung des wahren Wertes der Standardabweichung ist in der analytischen Praxis nicht realisierbar, da dafür unendlich viele Proben untersucht werden müssten.

Eine Stichprobe wird durch ihre Lage- und Streumaße beschrieben. Das geläufigste Lagemaß ist der arithmetische Mittelwert \bar{x} (Gleichung 22), der Quotient aus der Summe aller Werte x_i und deren Anzahl n .

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{Gleichung 22})$$

Als Streumaße werden hauptsächlich die Varianz $\hat{\sigma}^2$ und die Standardabweichung $\hat{\sigma}$ verwendet. Zur Berechnung der Varianz wird die Summe der quadratischen Abweichungen der Einzelwerte x_i vom Mittelwert \bar{x} gebildet, und anschließend diese Summe durch die um eins verminderte Anzahl der Einzelbestimmungen n dividiert (Gleichung 23).

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (\text{Gleichung 23})$$

Durch das Ziehen der Wurzel aus der Varianz lässt sich diese in die Standardabweichung umrechnen (Gleichung 24), die die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert beschreibt.

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\hat{\sigma}^2} \quad (\text{Gleichung 24})$$

Die prozentuale relative Standardabweichung RSD% eignet sich sehr gut, um die Streuung bzw. die Präzision verschiedener Verfahren und Messungen miteinander zu vergleichen, da sie die Abweichung relativ zur Größe des Mittelwertes \bar{x} angibt. Dazu wird die Standardabweichung auf den Mittelwert der Stichprobe bezogen (Gleichung 25). Die prozentuale relative Standardabweichung RSD% wird häufig auch als Variationskoeffizient bezeichnet, was sich von der englischen Bezeichnung für diesen Begriff, „coefficient of variation“ (CV), ableitet.

$$\text{RSD\%} = \frac{\hat{\sigma}}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (\text{Gleichung 25})$$

Jeder in einer analytischen Methode angewandte Arbeitsschritt wird einen Anteil zur gesamten Variation bzw. Präzision beitragen. Daher unterscheidet man in der

Analytik in der Regel vier verschiedene Präzisionsebenen, je nachdem, welche Einflussfaktoren in die betrachtete Präzision mit einfließen [34]: die Systempräzision, die Wiederholpräzision, die Intermediate Precision (der englische Begriff hat sich hier im Deutschen durchgesetzt) und die Vergleichspräzision.

Die Systempräzision (system precision, injection repeatability) wird durch wiederholte Messung derselben Probe bestimmt. Sie wird im Wesentlichen vom Messinstrument bestimmt.

Die Wiederholpräzision (Wiederhol-Standardabweichung, repeatability, $\hat{\sigma}_r$, $RSD_r\%$) wird durch mehrfache Anwendung des gesamten Analysenverfahrens, inklusive der Probenvorbereitung, in einem Labor vom gleichen Operator mit demselben Messinstrument und Testmaterial bestimmt. Dabei werden die Messungen innerhalb eines kurzen Zeitraumes nacheinander durchgeführt (innerhalb einer Serie, mit denselben Referenzstandards).

Die Intermediate Precision (Mehrtages-Standardabweichung, Intralabor-Standardabweichung, Labor-Vergleichspräzision) gibt die Streuung an, wenn die gleiche, vollständige Methode an verschiedenen Tagen, möglicherweise durch unterschiedliche Analytiker und mit unterschiedlicher Ausrüstung, aber noch innerhalb des gleichen Labors durchgeführt wird. Bei dieser Methode werden zusätzliche Streuungen des Standards (bei Kalibrierungen) sowie Einflüsse durch zeitliche Veränderungen (z.B. Temperaturschwankungen) miterfasst.

Die Ringversuchs-Standardabweichung (Interlabor-Standardabweichung, Vergleichspräzision, reproducibility) wird mit identischen Methoden und identischem Testmaterial in unterschiedlichen Laboren ermittelt. Bei diesem Präzisionsmaß werden besonders auch systematische Veränderungen durch äußere Einflussgrößen (z.B. Temperatur, Raumfeuchte, Reagenzienqualität, Ausbildungsstand des Laborpersonals etc.) berücksichtigt.

Über Monate und Jahre nähert sich die Mehrtages-Standardabweichung immer stärker der Vergleichs-Standardabweichung an, da auch innerhalb eines Labors über längere Zeiträume Personal und Instrumentierung wechseln. Daher wird der Begriff Vergleichs-Standardabweichung ($\hat{\sigma}_R$, $RSD_R\%$) auch übergeordnet verwendet.

1.2.2 Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Bei der Bestimmung einer Blindprobe kann die Basislinie mehr oder weniger stark schwanken. Diese Schwankung nennt man Rauschen. Das Verhältnis der Höhe des Messsignals zum Rauschsignal der Blindprobe wird als Signal-zu-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio, S/N) bezeichnet. Es wird meist zur Bestimmung der Detektionsgrenze (detection limit, DL) sowie der Bestimmungsgrenze (quantitation limit, QL) verwendet. Die Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses erfolgt mit Gleichung 26 [35, 36]:

$$\frac{S}{N} = \frac{2 \cdot H}{h_n} \quad (\text{Gleichung 26})$$

H entspricht der Höhe des gemessenen Signals von der Peakspitze bis zur extrapolierten Basislinie, während h_n für die größte Schwankung der Basislinie in einem Bereich von insgesamt 20 Peakhalbwertsbreiten ($b_{0,5}$) steht. Dieser Bereich kann symmetrisch um die Peakmitte liegen, aber auch unsymmetrisch, falls durch Matrixsignale erforderlich. Die Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses aus einem Elektropherogramm wird in Abbildung 1-17 erläutert.

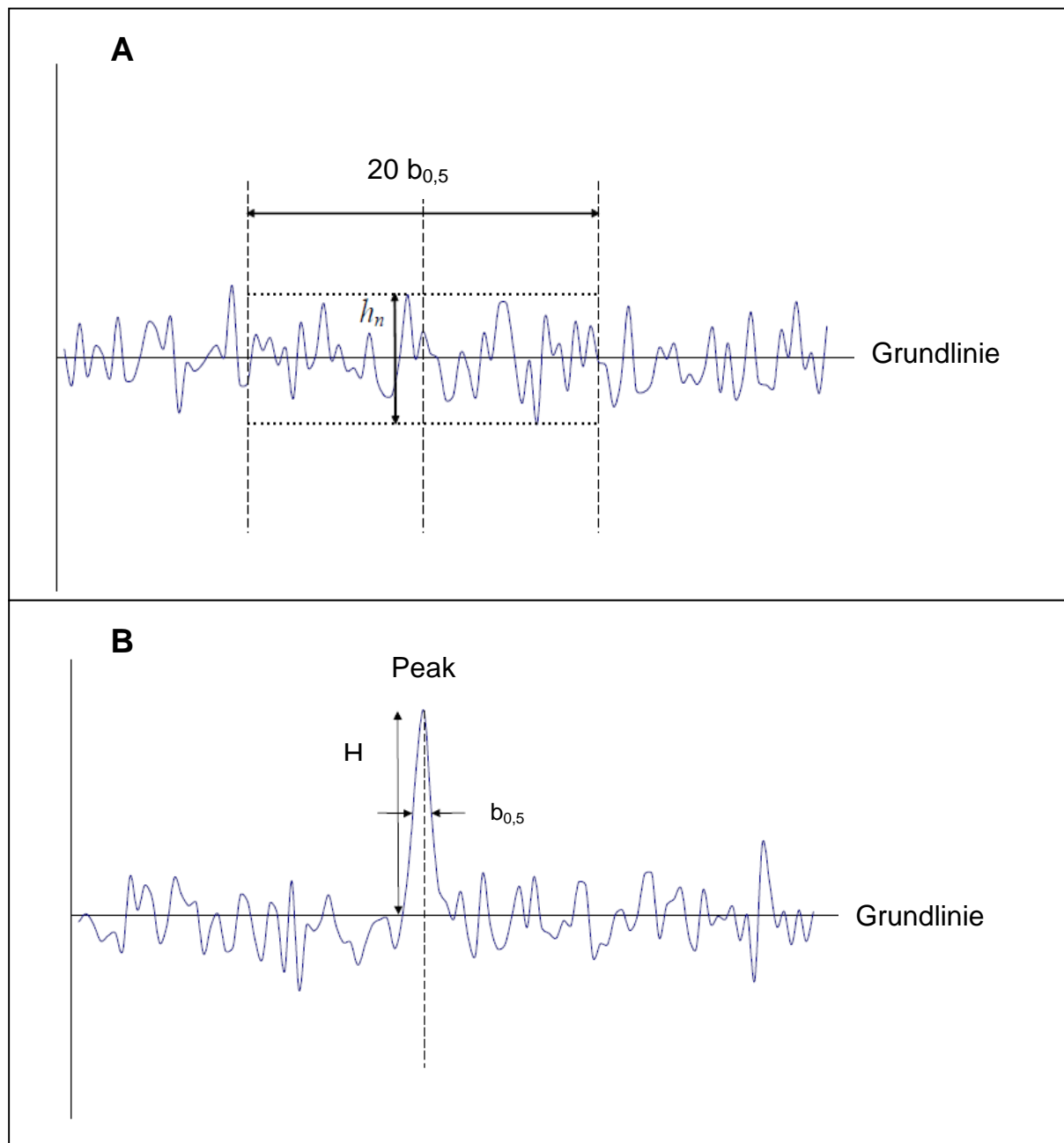


Abbildung 1-17: Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses aus einem Elektropherogramm: (A) Bestimmung des Rauschens aus dem Elektropherogramm einer Blindprobe und (B) Bestimmung der Peakhöhe in einem Elektropherogramm ($b_{0,5}$: Peakbreite auf halber Höhe des Peaks; $20 b_{0,5}$ Bereich um die Peakmitte herum, der dem 20fachen $b_{0,5}$ entspricht; h_n maximale Amplitude des Grundrauschens im Bereich der $20 b_{0,5}$; H : Peakhöhe von der Spitze bis zur Grundlinie (Ausgleichsgerade durch das Rauschen)).

1.2.3 Detektionsgrenze / Bestimmungsgrenze

Die Detektionsgrenze (engl.: Detection Limit, DL) einer Substanz ist die Substanzmenge oder –konzentration, die mit der vorgegebenen Methode sicher detektiert werden kann und bei der zusätzlich sichergestellt ist, dass die bei einer unbekannten Probe detektierten Signale eindeutig der gesuchten Substanz zugeordnet werden können [37]. Diese Substanzmenge muss also noch detektierbar sein, aber nicht zwangsläufig als exakter Wert quantifizierbar. Die Detektionsgrenze wird meist mit Hilfe des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (Gleichung 26) definiert. Die aktuellen Arzneibücher [35, 36] sowie die ICH-Guideline zur Validierung von analytischen Methoden [33] fordern ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 für die Detektionsgrenze.

Im Vergleich dazu ist die Bestimmungsgrenze (engl.: Quantitation Limit, QL) einer Substanz die Substanzmenge oder –konzentration, die mit einer vorgegebenen Präzision noch quantifiziert werden kann. Wenn diese Präzision als maximale relative Standardabweichung $RSD\%_{\max}$ angegeben wird, kann die Bestimmungsgrenze QL (Gleichung 27) aus der Verfahrensstandardabweichung $\hat{\sigma}(c)$ berechnet werden. Die Verfahrensstandardabweichung $\hat{\sigma}(c)$ (Gleichung 28) wird aus der Signal-Standardabweichung $\hat{\sigma}(y)$ und der Steigung der Kalibrierfunktion a_1 berechnet [38].

$$QL = \frac{\hat{\sigma}(c)}{RSD\%_{\max}} \cdot 100\% \quad (\text{Gleichung 27})$$

$$\hat{\sigma}(c) = \frac{\hat{\sigma}(y)}{a_1} \quad (\text{Gleichung 28})$$

Vereinfacht lässt sich die Bestimmungsgrenze wie die Detektionsgrenze auch über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ermitteln. Dies führt aber bei hoher erforderlicher Präzision ($< 1\% RSD\%$) nicht zu sinnvollen Ergebnissen. Ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 10 entspricht den Anforderungen der Arzneibücher [35, 36] zur Quantifizierung eines Messsignals.

1.2.4 Linearität

Die Linearität einer analytischen Methode beschreibt den direkten proportionalen Zusammenhang zwischen der Probenkonzentration (Stoffmenge) und dem Messsignal (Zielgröße) innerhalb des Arbeitsbereiches (range). Der Arbeitsbereich oder auch Bestimmungsbereich ist das Konzentrationsintervall, in dem der zu bestimmende Stoff mit angegebener Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann [33]. Bei der Bewertung bzw. Validierung einer analytischen Methode zur Quantifizierung sollte dieser Zusammenhang immer überprüft werden. Bereits durch die graphische Darstellung von fünf verschiedenen Messungen im Arbeitsbereich kann meist visuell entschieden werden, ob Linearität vorliegt oder nicht. Liegen jedoch die Messdaten von nur drei verschiedenen Konzentrationen vor, besteht eine Möglichkeit zur objektiven Bestimmung der Linearität, indem man die Steigungen der Geraden von der kleinsten zur mittleren und von der mittleren zur größten Konzentration miteinander vergleicht. Unterscheiden sich die beiden Steigungen nicht signifikant voneinander, so kann von einem linearen Zusammenhang ausgegangen werden [39].

1.3 Statistische Beurteilung von Analyseergebnissen

Zur Beurteilung analytischer Methoden kann nicht die komplette Grundgesamtheit, da diese prinzipiell unendlich groß ist, herangezogen werden, sondern nur eine Stichprobe, also eine kleine Anzahl von Daten. Diese Stichprobe lässt dann gute Rückschlüsse auf die Grundgesamtheit zu. Voraussetzung für die Bewertung von Messergebnissen ist die Kenntnis ihrer Häufigkeitsverteilung. In den meisten Fällen kann bei der Grundgesamtheit eine Normalverteilung der Werte angenommen werden. Die Form der Dichtefunktion entspricht dann der einer Gauß'schen Glockenkurve (Abbildung 1-18). Die Messdaten der Stichprobe sind annäherungsweise normalverteilt, wobei sich die Dichtefunktion mit steigender Stichprobenzahl derjenigen der Grundgesamtheit immer mehr annähert. Die Dichtefunktion lässt sich durch die Parameter arithmetischer Mittelwert \bar{x} und Standardabweichung $\hat{\sigma}$ genau beschreiben. \bar{x} teilt die Fläche unter der Kurve in zwei gleich große Hälften, während $\hat{\sigma}$ den halben Abstand der Kurvenwendepunkte

darstellt und somit die Kurvenform und das Ausmaß der Messwertstreuung charakterisiert. Bei kleiner Streuung ist die Kurve schmal und hoch, bei großer Streuung breit und flach.

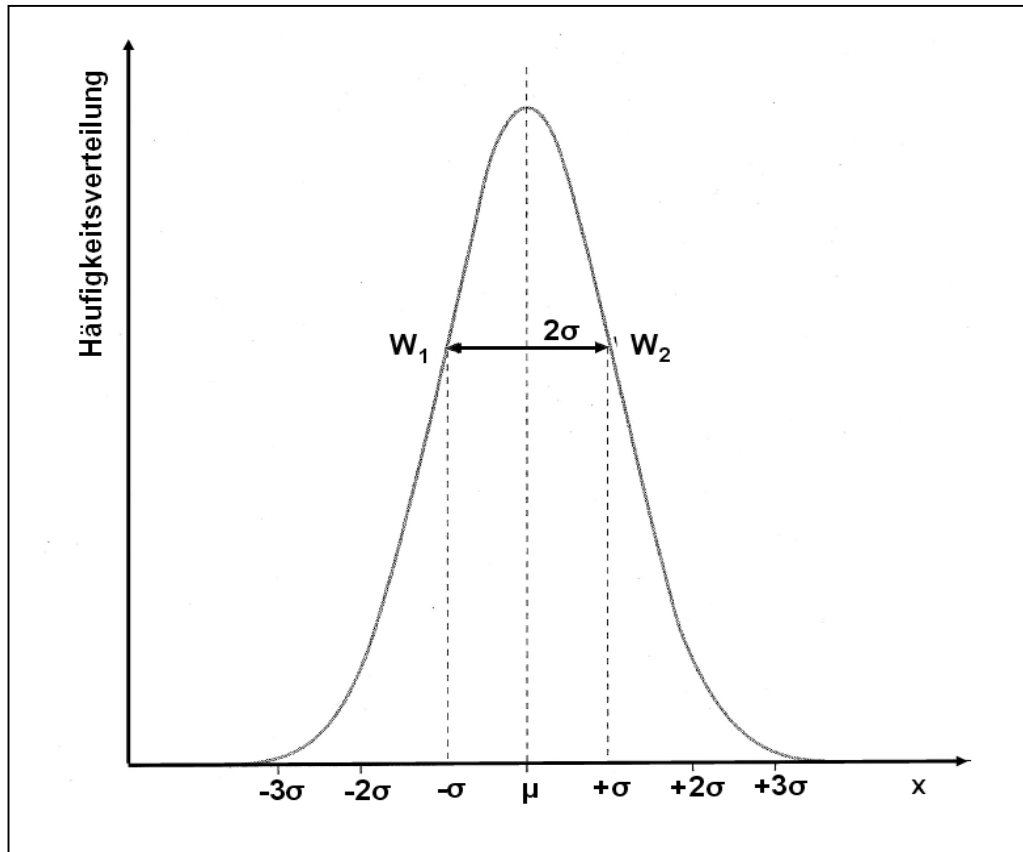


Abbildung 1-18: Gauß'sche Normalverteilung mit der geometrischen Bedeutung von Mittelwert μ und Standardabweichung σ ; W_1 und W_2 zeigen die beiden Wendepunkte der Kurve; aus [1].

Vor der Durchführung eines statistischen Tests ist es wichtig, genau zu definieren, was bewiesen bzw. widerlegt werden soll. Dazu wird zunächst eine Nullhypothese H_0 aufgestellt. Vergleicht man z.B. zwei Analysenmethoden miteinander, so könnte diese Nullhypothese folgendermaßen lauten: „Es gibt keinen Unterschied zwischen den Streuungen zweier Messreihen.“ Das logische Gegenteil der Nullhypothese ist die Alternativhypothese H_1 , die in diesem Fall lautet: „Es gibt einen Unterschied zwischen den Streuungen zweier Messreihen.“ Mit Hilfe eines statistischen Tests soll nun entschieden werden, welche der beiden Aussagen zutrifft. Beim Treffen einer

Entscheidung besteht immer die Möglichkeit eines Irrtums, da die Teststatistik nur auf einem Wahrscheinlichkeitsmodell basiert. Daher muss noch die Irrtumswahrscheinlichkeit α einbezogen werden. Diese gibt an, wie oft aus der Beantwortung der Testfrage falsch auf die Nullhypothese geschlossen wird. Wird beispielsweise $\alpha = 0,05$ gewählt und die Testfrage mit „ja“ beantwortet, d.h. die Nullhypothese wird angenommen („Ja, es gibt keinen Unterschied zwischen den Streuungen der beiden Messreihen.“), dann ist diese Entscheidung in 5% der Fälle falsch und in 95% richtig.

Nach Durchführung des statistischen Tests müssen nicht nur die beiden Fälle „ H_0 wahr“ und „ H_0 falsch, also H_1 wahr“ unterschieden werden, sondern insgesamt vier Fälle. Wenn die Nullhypothese H_0 wahr ist, kann der statistische Test diese bestätigen, oder auch irrtümlich ablehnen (Fehler 1. Art, α -Fehler), obwohl sie hätte angenommen werden müssen (Ablehnung einer richtigen Hypothese). Wenn die Alternativhypothese H_1 wahr ist, gibt es ebenfalls zwei Fälle: der Test lehnt die Nullhypothese richtigerweise ab und führt zur Annahme der Alternativhypothese H_1 oder die Nullhypothese wird irrtümlich beibehalten (Fehler 2. Art, β -Fehler), obwohl sie hätte abgelehnt werden müssen (Nichtablehnung einer falschen Hypothese) [39].

In dem eben beschriebenen Fall sind zwei Alternativhypothesen denkbar: „ $\hat{\sigma}_1 > \hat{\sigma}_2$ “ oder „ $\hat{\sigma}_1 < \hat{\sigma}_2$ “. Daher handelt es sich hier um einen zweiseitigen Test. Bei zweiseitigen Tests müssen die irrtümlichen Abweichungen in beiden Richtungen berücksichtigt werden. Daher sind die hier tabellierten Grenzen weiter gefasst als die der entsprechenden einseitigen Tests mit gleicher Irrtumswahrscheinlichkeit.

1.3.1 F-Test

Um die Streuung zweier unabhängiger Stichproben miteinander zu vergleichen, verwendet man einen F-Test. Dabei wird geprüft, ob zwischen den Varianzen ein statistisch signifikanter Unterschied besteht. Zunächst wird die Varianz jeder Stichprobe berechnet, und anschließend wird der Quotient F_0 der Varianzen gebildet, wobei darauf zu achten ist, dass die größere Varianz im Zähler und die kleinere im Nenner steht (Gleichung 29). Der so berechnete Wert F_0 wird schließlich mit einem

tabellierten, kritischen Wert F_{krit} oder $F_{n_1-1, n_2-1, \alpha}$ der theoretisch berechneten F-Verteilung verglichen. Ist F_0 größer als der tabellierte Wert, so liegt ein signifikanter Unterschied in der Streuung beider Stichproben vor.

$$F_0 = \frac{\hat{\sigma}_2^2}{\hat{\sigma}_1^2} \quad \text{mit} \quad \hat{\sigma}_2^2 > \hat{\sigma}_1^2 \quad (\text{Gleichung 29})$$

Da besonders bei kleinen Datenzahlen die Streumaße verschiedener Stichproben stark schwanken können, müssen sie sich sehr stark voneinander unterscheiden, bevor eine Differenz mit Hilfe des F-Tests als signifikant erkannt werden kann. Dies birgt die Gefahr eines β -Fehlers, d.h. dass wirklich unterschiedliche Varianzen nicht mehr unterschieden werden können. Zur Verringerung des β -Fehlers kann einerseits die Datenzahl erhöht werden, andererseits aber auch ein größerer α -Fehler zugelassen werden, da ein größerer α -Fehler einen kleineren β -Fehler bewirkt [39].

1.3.2 Ausreißertests

Mitunter treten in Messreihen grob abweichende Werte auf, die überwiegend unerklärlich entstehen. Es stellt sich dann die Frage, ob dieser Extremwert noch zu der vorliegenden Grundgesamtheit gehört, oder ob hier ein sogenannter Ausreißer vorliegt. Man spricht von Ausreißern, wenn ein Messwert oder ein Befund nicht in eine erwartete Messreihe passt oder allgemein nicht den Erwartungen entspricht. Die Erwartung wird meist als Streubereich um den Erwartungswert herum definiert, in dem die meisten Messwerte liegen. Werte außerhalb dieses Intervalls werden als Ausreißer bezeichnet. Es gibt eine Reihe von Ausreißertests, die dazu dienen, Daten innerhalb einer Datenreihe, die als extrem unwahrscheinlich angesehen werden können, zu identifizieren. Auf einige gängige Ausreißertests sowie auf deren Bewertung wird in Kapitel 5 näher eingegangen.

1.3.3 Varianzkomponenten

Um die wahre Präzision einer analytischen Methode zuverlässig zu bestimmen, sind in der Regel sehr hohe Datenzahlen notwendig, wodurch sehr hohe Kosten und meist sehr langen Messzeiten für die entsprechenden Analysenserien entstehen. Daher besteht großes Interesse an der Schätzung der Messunsicherheit. Eine Möglichkeit zur Abschätzung besteht in der Beurteilung der einzelnen Varianzkomponenten [34].

Bei dieser Methode wird die Gauß'sche Fehlerfortpflanzungsrechnung eingesetzt. Die Gesamtvarianz setzt sich aus der Summe der Einzelvarianzen aller fehlerbehafteten Größen zusammen, gegebenenfalls gewichtet mit den zugehörigen partiellen Ableitungen. Im einfachsten Fall sind nur zwei voneinander unabhängige Varianzkomponenten vorhanden. Somit ergibt sich nach Gleichung 30 eine Gesamtvarianz $\hat{\sigma}_{ges}^2$ aus der Summe der Varianzkomponenten $\hat{\sigma}_1^2$ und $\hat{\sigma}_2^2$. Nach dem allgemeinen Fehlerfortpflanzungsgesetz verhalten sich die Varianzen additiv, aber nicht die Standardabweichungen. Ist man jedoch an der Gesamtstandardabweichung einer Methode interessiert, muss nach der Addition der Varianzen wieder die Wurzel aus der Summe gezogen werden.

$$\hat{\sigma}_{ges}^2 = \hat{\sigma}_1^2 + \hat{\sigma}_2^2 \quad (\text{Gleichung 30})$$

Zur Beurteilung von Analysenverfahren sind meist jedoch sehr viele Varianzkomponenten zu beachten. Der gesamte analytische Prozess setzt sich aus sehr vielen Teilschritten zusammen, wie die Probennahme, Probenvorbereitung, Messung und Auswertung sowie die Fertigkeit des Analytikers, wobei jeder Schritt mit einer gewissen Unsicherheit verbunden ist. Die eben beschriebenen Teilschritte lassen sich jedoch jeder für sich weiter aufteilen. So können bei der Probenvorbereitung z.B. Wäge- und Verdünnungsvarianzen hinzukommen. Da es Varianzkomponenten gibt, die nicht unabhängig voneinander sind, müssen zusätzliche Kovarianzterme berücksichtigt werden, wodurch die Abschätzung der Unsicherheit aus Varianzkomponenten auch mit einem erheblichen Aufwand verbunden ist. Durch den Einsatz geeigneter Software kann dieser Aufwand allerdings teilweise reduziert werden [34]. Der Beitrag kleinerer Varianz-

komponenten, wie z.B. Wäge- und Volumenfehler, lässt sich meist sehr leicht abschätzen, aber gerade diese spielen nur eine untergeordnete Rolle. Da sich, wie bereits erwähnt, die Varianzen und nicht die Standardabweichungen additiv verhalten, wirken sich auch die Fehler im Quadrat aus. Daher spielen kleine Fehler für den Gesamtfehler nahezu keine Rolle. Die Größe der entscheidenden Varianzkomponente kennt man häufig nicht. Man behilft sich mit Schätzungen und Annahmen, aber die machen die Gesamtaussage so vage, dass man auch direkt den Gesamtfehler schätzen kann [34].

2 Aufgabenstellung

Durch die schnelle Entwicklung und die wachsende Zahl von Biotherapeutika entstand ein gesteigertes Interesse an leistungsfähigen Methoden zur Proteincharakterisierung. Dies stellte die pharmazeutische Industrie vor eine besondere Herausforderung, da Proteine wesentlich komplexer sind als herkömmliche, chemisch hergestellte Wirkstoffe. Jedes Protein stellt je nach Struktur und Wirkmechanismus seine ganz eigenen Anforderungen an die Analytik [40]. Kritische Faktoren, die eine Herausforderung für die Analytik darstellen, sind z.B. der isoelektrische Punkt (pI), die Größe (Molekulargewicht), Struktur (Tertiär-/Quartärstruktur), Hydrophobizität, Löslichkeit und Stabilität der Proteine. Der Wissensstand auf diesem Gebiet entwickelt sich ständig weiter.

Besonders im Bereich der pharmazeutischen Analytik spielt neben der qualitativen die quantitative Bestimmung von Substanzen, sowohl von Haupt- (Wirkstoffen) als auch Nebenprodukten (Verunreinigungen), eine wichtige Rolle. Um eine gleichbleibend hohe Arzneimittelqualität und –sicherheit zu gewährleisten, fordern die Zulassungsbehörden, wie das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), die European Medicines Agency (EMA) oder das Food and Drug Administration (FDA), in Anlehnung an die Qualitätsrichtlinie Q2 der International Conference on Harmonisation (ICH) valide Methoden in der Arzneimittelanalytik. Eine besondere Herausforderung ist dabei die Entwicklung einer exakten, robusten und reproduzierbaren Quantifizierungsmethode, die allerdings eine unabdingbare Voraussetzung für die sichere Produktion von Medikamenten ist.

Unumstrittene Vorteile der 2D-Gelelektrophorese gegenüber anderen Analyseverfahren sind die hervorragende Trennleistung und Selektivität. Dadurch findet die Gelelektrophorese, häufig in Kombination mit weiteren, nachgeschalteten Techniken wie der Massenspektrometrie (MS), Anwendung in der Qualitätskontrolle therapeutisch wirksamer Proteine (vgl. Kap. 1.1.4) [32]. Dem gegenüber steht allerdings auch eine gravierende Limitation, die unbefriedigende quantitative Reproduzierbarkeit bzw. Präzision. Bei der Quantifizierung von Proteinen mittels 2-DE werden in der Literatur prozentuale relative Standardabweichungen von 15 - 60% RSD% bezogen auf die Spotintensitäten [41-45] angegeben. Aufgrund

dieser unzureichenden Präzision wurde die 2-DE in der Routinequantifizierung noch nicht etabliert.

Präzision und Reproduzierbarkeit sind die wichtigsten Parameter in der quantitativen Analyse [46]. Ohne analytische Präzision ist eine richtige Beurteilung von Veränderungen in einem untersuchten System unmöglich. Besonders für die Bewertung der Qualität von Arzneimitteln ist eine gute Präzision, d.h. eine möglichst geringe prozentuale relative Standardabweichung (RSD%), erstrebenswert. Daher ist eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit und Präzision in der Gelelektrophorese unbedingt notwendig.

Ziel dieser Arbeit ist eine genaue Analyse und Bewertung der einzelnen Arbeitsschritte der komplexen Technik der 2D-Gelelektrophorese, um die Hauptfehlerquellen zu identifizieren, die für die schlechte Präzision verantwortlich sind, woraus sich dann Möglichkeiten einer Verbesserung der Präzision ableiten lassen.

In allen Messreihen können Messwerte auftauchen, die von den übrigen Werten stark abweichen und deren Ursache meist unerklärlich ist. Besonders bei der Untersuchung von Naturprodukten tauchen immer wieder solche Extremwerte auf, bedingt durch die Zusammensetzung des biologischen Materials, das unvermeidbaren Schwankungen unterliegt. Daher beobachtet man häufig auch in der Bioanalytik, also in der Untersuchung biologischer Makromoleküle wie z.B. Proteine, solche Extremwerte. Mit Hilfe verschiedener Ausreißertests können einzelnen Daten innerhalb einer Messreihe, die als extrem unwahrscheinlich angesehen werden, untersucht und als Ausreißer identifiziert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist, die Untersuchung von Extremwerten sowie die Bewertung der Leistungsfähigkeit solche Ausreißertests anhand von simulierten Datensätzen.

3 Analyse der Technik der 2-DE

3.1 Arbeitstechnik

Wie in Kapitel 1.1.3.4 bereits erläutert, gliedert sich die Trenntechnik der zweidimensionalen Gelelektrophorese in sehr viele Arbeitsschritte und ist daher eine sehr komplexe und zeitaufwendige Prozedur. Die einzelnen Arbeitsschritte, die notwendig sind, um eine 2-DE durchzuführen, sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Die Punkte 2a und 2b können auch, je nach Beladungstechnik, in einem Arbeitsschritt zusammengefasst werden. Bei einer solchen Rehydratisierungsbeladung diffundiert die Probe in den IPG-Streifen hinein, während dieser aufquillt. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte der zweidimensionalen Gelelektrophorese noch einmal kurz erläutert und auf Schwierigkeiten hingewiesen, die bei jedem Arbeitsschritt auftreten könnten, aber möglichst umgangen werden sollten.

Tabelle 3-1: Die einzelnen Arbeitsschritte der zweidimensionalen Gelelektrophorese.

	Arbeitsschritt
1	Probelösung
2a	IPG-Streifen Rehydratisierung (Quellung des getrockneten IPG-Streifens)
2b	Beladung des IPG-Streifens mit der Probe
3	Trennung in der 1. Dimension (IEF)
4	IPG-Streifen-Äquilibration
5	Trennung in der 2. Dimension (SDS-PAGE)
6	Proteindetektion (Visualisierung, Sichtbarmachen der getrennten Proteine)
7	Spotintegration (Analyse und Interpretation)

Das Grundprinzip der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Tabelle 3-1) wurde seit ihrer Einführung nicht wesentlich verändert, jedoch die Handhabung dieser Trenntechnik wurde weiterentwickelt und optimiert. Hierbei sind besonders die Arbeiten von Anderson et al. [47, 48] und Görg und Mitarbeitern [14, 20, 49, 50] zu nennen. Letztere entwickelte die zweidimensionale Gelelektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) mit deutlicher Verbesserung hinsichtlich Auflösungsvermögen und Reproduzierbarkeit der 2D-Technik. IPG-Streifen sind getrocknete Gele, die einen fixierten pH-Gradienten in der Gelmatrix enthalten. Diese getrockneten Gele sind auf einer Plastikfolie befestigt. Durch die Einführung dieser IPG-Streifen wurde die Handhabung extrem erleichtert, da die Gele durch die Plastikfolie nicht mehr so leicht reißen oder sich verformen können.

Zu Beginn jeder analytischen Methode, so auch bei der 2-DE, steht die Vorbereitung und Herstellung der Probelösung. Proteine sind besonders anfällig für die Bildung von Aggregaten, die dann schwer löslich sind. Daher sollte idealerweise eine gelungene Probenvorbereitung dazu führen, eine Aggregation, Denaturierung und Reduktion der Proteine des Ausgangsmaterials zu verhindern, um so zu gewährleisten, dass sie komplett gelöst vorliegen. Zusätze wie Harnstoff und Thioharnstoff in der Probelösung brechen hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen in und zwischen den Proteinen, wodurch ihre Löslichkeit erhöht wird. Zwitterionische Detergenzien (z.B. CHAPS) verhindern die erneute Aggregation denaturierter Proteine und der Zusatz von Trägerampholyten verbessert die Löslichkeit dieser. Störende Substanzen wie Lipide und Salze, die die Qualität der Elektrophorese beeinflussen, sollten entfernt werden.

Vor der Trennung in der ersten Dimension ist darauf zu achten, dass das Gel des verwendeten IPG-Streifens komplett aufgequollen ist, denn nur so ist die Durchführung einer Elektrophorese möglich. Zur Probelösung wird zusätzlich etwas Bromphenolblau hinzugegeben. Dieser Farbstoff wandert während der Trennung in der ersten Dimension zur Anode und dient somit der Kontrolle, ob ein Stromfluss vorhanden ist und ob die IEF überhaupt stattfindet.

Nach erfolgter IEF wird die IPG-Streifen-Äquilibration durchgeführt. In diesem Schritt werden die IPG-Streifen mit SDS beladen. Dabei bilden sich Protein-SDS-Komplexe, die für einen Transfer der Proteine auf das 2D-Gel notwendig sind. Dieser

Arbeitsschritt besteht aus zwei Teilschritten. Im ersten werden die Proteine reduziert. Dazu wird der Äquibrierungslösung Dithiothreitol (DTT) oder Mercaptoethanol zugesetzt, welche dafür sorgen, dass die im Protein enthaltenen Disulfidbrücken gespalten werden. Im zweiten Schritt werden die so entstandenen freien Thiolgruppen durch Jodacetamid alkyliert, das nun anstatt des DTT im Äquibrierungspuffer enthalten ist. So kann eine Reoxidation der Proteine während der weiteren Elektrophorese verhindert werden.

Für die Trennung in der zweiten Dimension werden die äquibrierten IPG-Streifen auf die Kante des SDS-Gels gelegt und dort mit einer heißen Agaroselösung fixiert (Abbildung 1-15). Beim Eingießen der Agaroselösung ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstehen und im Gel eingeschlossen werden, denn diese verhindern den Aufbau eines homogenen elektrischen Feldes. Der Agaroselösung wird ein Farbstoff zugesetzt, der während der SDS-PAGE mitwandert. Dieser Farbstoff sollte eine hohe elektrophoretische Mobilität besitzen, so dass er direkt hinter der Front des Laufpuffers wandert und so die Laufront markiert. Auch hier kommt, wie schon während der IEF, häufig Bromphenolblau zum Einsatz. Die Elektrophorese ist beendet, wenn der Farbstoff den unteren Rand des Gels erreicht hat.

3.2 Detektionsmethoden

Nach erfolgter Elektrophorese müssen die im Gel getrennten Proteine zur weiteren Analyse und Quantifizierung sichtbar gemacht werden. Dieser Arbeitsschritt der Proteindetektion teilt sich im Allgemeinen in drei weitere Arbeitsschritte auf: (i) Fixieren, (ii) Färben und (iii) Entfärben.

Vor oder mit dem Färben werden die Proteine im Gel fixiert, d.h. denaturiert und ausgefällt. Meist wird dazu eine Mischung aus Alkohol-Essigsäure-Wasser (im Verhältnis 3:1:6) verwendet. In dieser Fixierungslösung kann der Farbstoff auch schon enthalten sein. Die Essigsäure wird manchmal auch durch Trichloressigsäure ersetzt. Der Alkohol dehydriert die Proteine, während die Säure den pH-Wert der

Lösung senkt. Auf diese Weise wird die Hydratationshülle der Proteine beschädigt. Als Folge wird die Löslichkeit reduziert und die Proteine fallen aus.

Für die anschließende Färbung stehen eine Reihe von direkten und indirekten Detektionsmethoden zur Verfügung [51-54]: Färbung mit Farbstoffen wie Coomassie Brilliant Blue (CBB), Silberfärbung und Fluoreszenzfarbstoffe oder auch die Markierung mit radioaktiven Isotopen (z.B. mit ^{14}C , ^3H , ^{35}S , etc.). Die einzelnen Detektionsmethoden werden in den folgenden Kapiteln kurz erläutert.

Die Empfindlichkeit der Farbstoffe ist sehr unterschiedlich (vgl. Tabelle 3-2) [52, 53, 55]. CBB und Fluoreszenz-Farbstoffe sind weniger empfindlich als die Silberfärbung. Ein gemeinsamer Nachteil aller Färbemethoden ist die hohe Gelhintergrundfärbung, die je nach Färbung einen mehr oder weniger aufwendigen Entfärbeprozess fordert. Bei dem Entfärbeschritt wird der Hintergrund des Trennmediums entfärbt, so dass nur noch die gefärbten Proteinspots bzw. -banden sichtbar sind. Eine zu lange Entfärbezeit kann allerdings auch zum Verschwinden sehr schwacher Proteinbanden führen.

3.2.1 Coomassie-Färbung

Eine einfache Handhabung, preisgünstige Reagenzien sowie Kompatibilität mit nachgeschalteten Analysenmethoden, wie z.B. der Massenspektrometrie, machen die Coomassie-Farbstoffe zu den beliebtesten und am häufigsten verwendeten Farbstoffen in der Proteindetektion. Der Farbstoff gehört zu den Triphenylmethanfarbstoffen, der recht unspezifische Wechselwirkungen mit den basischen Seitenketten der Aminosäuren (Arginin-, Lysin-, Histidinreste) eingeht. Somit hängt die Spotintensität sehr stark von der Struktur der Proteine ab. Dies führt zu verschiedenen Beziehungen zwischen Spotintensität und Proteingehalt zwischen den verschiedenen Proteinen.

Aufgrund der relativ unspezifischen Wechselwirkungen des Coomassie Brilliant Blue-Farbstoffes (CBB) werden nicht nur die Proteine angefärbt, sondern auch die Gelmatrix. Durch die Entwicklung einer kolloidalen Formulierung des Coomassie-Farbstoffes (Colloidal Coomassie Blue-Farbstoff (CCB)) konnte die hohe

Gelhintergrundfärbung reduziert und die Empfindlichkeit des Farbstoffes erhöht werden [56, 57]. Die Detektionsgrenze für den Coomassie Brilliant Blue-Farbstoff liegt bei ungefähr 100 ng Protein/Spot [52, 53, 58], durch die Veränderung als kolloidale Formulierung konnte die Detektionsgrenze sogar auf 8-10 ng Protein/Spot erhöht werden [53, 58, 59].

3.2.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist ca. 100-mal empfindlicher als die Coomassie Färbung. Die Detektionsgrenze liegt bei < 1 ng Protein/Spot. Jedoch lassen sich nicht alle Proteine mit Silber anfärben. Bei der Färbung werden die Silberionen von den präzipitierten Proteinen gebunden und dort durch Reduktion in Silberkeime, die im Folgenden als Katalysator dienen, umgewandelt. Die Reduktion wird durch die Aminosäurereste und die Peptidbindungen in den Proteinen verursacht. Die Silberionen im Gel werden mit Hilfe der Silberkeime von einem starken Reduktionsmittel (meist wird Formaldehyd verwendet) zu metallischem Silber reduziert. Diese Reaktion verläuft in der Nähe der Silberkeime, also an den Proteinbanden, wesentlich schneller ab, wodurch die Proteinbanden sich dunkelbraun bis schwarz verfärben. Die Bildung von metallischem Silber erfolgt jedoch nicht nur in der Nähe der Proteine, sondern im gesamten Gel und schwärzt damit den Hintergrund. Daher ist die Färbung mit Hilfe einer pH-Wertänderung schnell zu stoppen.

Großer Vorteil dieser Färbemethode ist die sehr hohe Empfindlichkeit. Die Farbintensität der Proteinspots hängt jedoch sehr stark von der Durchführung der Färbung ab, da die Silberfärbung keinen Endpunkt besitzt. Wird die Entwicklungszeit zu lang gewählt, so wird der Hintergrund zu dunkel, was eine korrekte Bestimmung der Spots bzw. Banden sehr schwierig macht. Die Silberfärbung ist somit eine sehr komplizierte und wenig reproduzierbare Färbemethode.

3.2.3 Fluoreszenz-Farbstoffe

Eine weitere sehr empfindliche Detektionsmethode steht mit den Fluoreszenz-Farbstoffen zur Verfügung. SYPRO Ruby, der erste Fluoreszenz-Farbstoff, ist eine Rutheniumkomplex-Verbindung, die wie die Coomassie-Farbstoffe nichtkovalente Bindungen mit den Lysin-, Arginin- und Histidin-Resten der Proteine eingehen. Im Vergleich zur Silberfärbung hängt die Spotintensität nicht so stark von der Entwicklungszeit ab, so dass die Gelhintergrundfärbung bei dieser Methode reduziert wird, was in einer hohen Empfindlichkeit von ca. 1 ng Protein/Spot resultiert. Als weitere Vorteile sind hier noch die gute Verträglichkeit mit nachgeschalteten Analysenmethoden, die einfache Handhabung und die relativ geringe Toxizität der Reagenzien zu nennen. Inzwischen steht eine beträchtliche Auswahl anderer Fluoreszenz-Farbstoffe zur Verfügung. Mit Deep Purple soll noch ein weiterer häufig in der 2-DE verwendeter Farbstoff genannt werden. Dieser enthält Epicocconon als Fluoreszenz-Farbstoff aus dem Pilz *Epicoccum nigrum*, der mit primären Aminen, wie z.B. mit den Lysinresten, nichtkovalente Bindungen eingeht, wodurch sich ein rot-fluoreszierendes Enamin bildet.

Tabelle 3-2: Proteinfärbungen und ihr Detektionsgrenzen.

Färbemethode	Detektionsgrenze	Detektionsmethode
Silberfärbung		
saure Methode	1 ng Protein/Spot [53, 58]	Densitometrie
basische Methode	< 1 ng Protein/Spot [53, 59]	
SYPRO Ruby	1 ng Protein/Spot [53, 58, 59]	Fluoreszenz
Deep Purple	1 ng Protein/Spot [53, 60, 61]	Fluoreszenz
Coomassie Brilliant Blue	30 - 100 ng Protein/Spot [52, 53, 59]	Densitometrie
Colloidal Coomassie Blue	8 - 10 ng Protein/Spot [53, 58, 59]	Densitometrie

3.2.4 Radioaktive Markierung

Eine weitere Möglichkeit die getrennten Proteine zu detektieren, ist die Markierung mit radioaktiven Isotopen [51, 52, 62]. Diese Detektionsmethode war für die Arbeit nicht von Bedeutung, soll hier aber der Vollständigkeit halber kurz erwähnt werden. Die Markierung der Proteine mit radioaktiven Isotopen (^{14}C , ^3H , ^{35}S , etc.) kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erfolgen. Bei der *in vivo* Markierung werden radioaktiv markierte Substrate während des Zellwachstums in die Proteine eingebaut, bei der *in vitro* Markierung erfolgt die Markierung der Proteine durch Zugabe chemisch modifizierter Substanzen nach der Zellyse. Die so markierten Proteine können nach erfolgter Elektrophorese mittels Autoradiographie oder Massenspektrometrie detektiert werden.

Für die Autoradiographie werden die Gele getrocknet, und anschließend wird ein Film aufgelegt. Nach „Belichtung“ des Films durch die von den Isotopen ausgehenden Strahlung (β -, γ -Strahlung) ist auf dem entwickelten Film die Position des Proteins sichtbar. Für die Massenspektrometrie müssen die Proteinspots zunächst aus dem Gel herausgelöst werden. Die Peakintensitäten der markierten Proteine können anschließend über einen massenspektrometrischen Vergleich ausgewertet werden.

3.2.5 Difference Gel Electrophoresis (DIGE)

Ünlü und Mitarbeiter [63] entwickelten eine spezielle Technik der 2-DE, die sogenannte DIGE, zum quantitativen Vergleich verschiedener Proteinexpressionslevel. Bei dieser Technik werden die Lysinreste der Proteine mit einem von drei verschiedenen Fluoreszenz-Cyanin-Farbstoffen (Cy2, Cy3, Cy5) markiert. Dabei wird eine dieser markierten Proben als interner Standard verwendet und dient zur Normalisierung aller Proteinspots [58, 64-67]. Diese Standard-Probe besteht idealerweise zu gleichen Teilen aus den zu untersuchenden Proben. Alle drei markierten Proben werden vereint und mit Hilfe der 2-DE auf nur einem Gel getrennt. Drei Gelbilder werden durch drei verschiedene Anregungswellenlängen erhalten. Diese Gelbilder werden anschließend übereinandergelegt, so dass die qualitativen

und quantitativen Unterschiede zwischen den untersuchten Proben mit Hilfe einer speziellen Software untersucht werden können.

Mit dieser Technik kann die Anzahl der Gele, die für die Analyse der Proben notwendig sind, verringert werden, wodurch auch die Gel-zu-Gel Variabilitäten reduziert werden. Außerdem werden lange und arbeitsaufwendige Färbe- und Entfärbe-Prozesse umgangen. Jedoch werden zur Durchführung dieser Technik sehr teure Geräte und Reagenzien [6] benötigt, wodurch diese in der Routineanalytik nur selten Anwendung findet.

3.3 Vorüberlegungen

Um die Technik der zweidimensionalen Gelelektrophorese zu analysieren, wurde ein bewährtes Protokoll nach Görg et al. [21] ausgewählt und mit kleinen Veränderungen durchgeführt. Für die Analyse wurde zunächst kein komplexes Proteingemisch verwendet, welches aus einer echten biologischen Probe extrahiert wurde, sondern eine überschaubare Proteinmischung, bestehend aus acht Standardproteinen. Auf diese Weise wurden Unterschiede in der Zusammensetzung der Probe, die in biologischen Materialien unvermeidbar auftreten, sowie durch das Extraktionsverfahren bedingte Schwankungen umgangen. Folgende saure als auch basische Proteine verschiedener Größe wurden für die Untersuchungen herangezogen: Cytochrom C (pI 9,8, M_r 11,7 kDa), Ribonuclease b (pI 9,3, M_r 13,7 kDa), Myoglobin (pI 7,5, M_r 17,8 kDa), Catalase (pI 7,3, M_r 58,0 kDa), Albumin (pI 6,3 – 6,5, M_r 67,0 kDa), Glucoseoxidase (pI 5,5, M_r 77,0 kDa), β -Lactoglobulin (pI 5,5, M_r 18,4 kDa) und Pepsin (pI 3,2, M_r 34,6 kDa).

Die Trennung in der ersten Dimension wurde mit Hilfe von IPG-Streifen (180 x 3 x 0,5 mm) über einen pH-Bereich von pH 3 bis 10 durchgeführt. Die Beladung und Quellung der IPG-Streifen erfolgten in einem Schritt über eine Rehydratisierungsbeladung. In der zweiten Dimension wurden 12-15%-ige Polyacralamidgradientengele (18 cm x 20 cm x 1 mm) verwendet.

Zur Detektion der getrennten Proteine wurden zwei Farbstoffe ausgewählt, die auch in der Routineanalytik häufig zum Einsatz kommen: ein Fluoreszenz- und ein

Coomassie-Farbstoff. Da Fluoreszenzfarbstoffe jedoch sehr teuer sind, wurde im Vorfeld, wie bei Rabilloud et al. [68] beschrieben, der Farbstoff Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthroline disulfonate) (RuBPS) selbst synthetisiert. Hierbei handelt es sich um den gleichen Rutheniumkomplex, der auch in der gebrauchsfertigen SYPRO Ruby-Färbelösung enthalten ist. Als Coomassie-Färbung fand die sogenannte Coomassie Blue Silver Methode nach Candiano et al. [69] Anwendung, eine modifizierte Coomassie-Färbung der klassischen Neuhoff-Methode [57]. Diese kolloidale Coomassie-Färbung und die Fluoreszenz-Färbungen sind beide ähnlich empfindliche Detektionsmethoden, die aber weniger empfindlich als die Silberfärbung sind. Da jedoch die klassische Silberfärbung aufgrund der stark schwankenden Gelhintergrundfärbung schlecht reproduzierbar ist, wurde sie für die weiteren Untersuchungen außer Acht gelassen. Die Detektion mittels radioaktiver Markierung sowie die DIGE-Technik sind sehr teure und aufwendige Methoden, die somit in der Routineanalytik nur selten Anwendung finden, und daher hier auch nicht weiter betrachtet wurden.

3.4 IPG-Streifen Äquilibration

Abbildung 3-1 zeigt ein typisches 2D-Gelbild, wie man es nach Trennung der acht Standardproteine erhält. Zusätzlich zu den Hauptspots sind noch weitere, kleinere angefärbte Bereiche, besonders an der Kontaktfläche zwischen IPG-Streifen und 2D-Gel, zu erkennen. Diese Beobachtung führt zu dem Schluss, dass der Transfer der Proteine von der ersten auf die zweite Dimension nicht quantitativ erfolgt ist. Der Äquilibrationsschritt, welcher der Trennung in der zweiten Dimension vorangeschaltet ist, könnte hierfür die Ursache sein. In diesem Schritt werden die im IPG-Streifen fokussierten Proteine mit SDS beladen, was notwendig ist, um den Transport der Proteine vom IPG-Streifen auf das SDS-Gel der zweiten Dimension zu gewährleisten. Sollte der IPG-Streifen nicht ausreichend mit SDS gesättigt sein, ist ein quantitativer Transport der Proteine auf das 2D-Gel nicht gesichert.

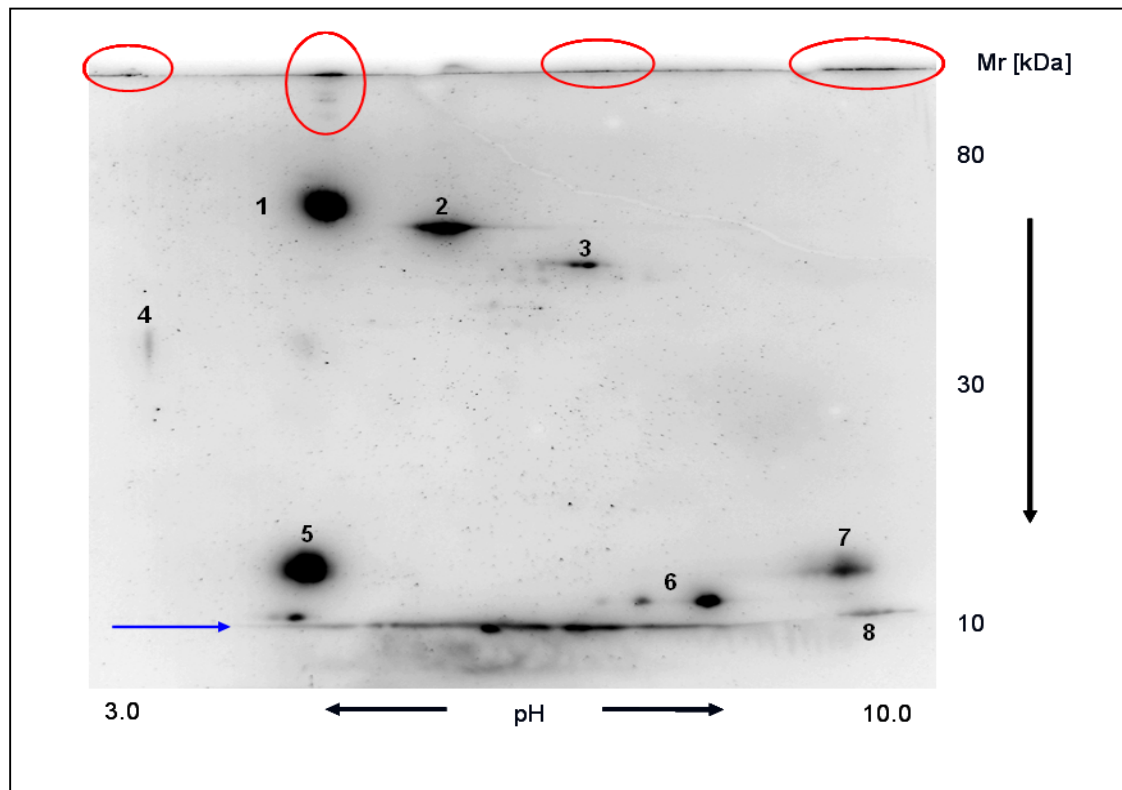


Abbildung 3-1: 2D-Gelbild nach Trennung der acht Standardproteine: 1 Glucoseoxidase (pI 5,5, M_r 77,0 kDa), 2 Albumin (pI 6,3 – 6,5, M_r 67,0 kDa), 3 Catalase (pI 7,3, M_r 58,0 kDa), 4 Pepsin (pI 3,2, M_r 34,6 kDa), 5 β -Lactoglobulin (pI 5,5, M_r 18,4 kDa), 6 Myoglobin (pI 7,5, M_r 17,8 kDa), 7 Ribonuclease b (pI 9,3, M_r 13,7 kDa) und 8 Cytochrom C (pI 9,8, M_r 11,7 kDa). Von links nach rechts erfolgte die Trennung in der ersten Dimension mittels IEF, von oben nach unten die Trennung aufgrund der Molekülgröße mittels SDS-PAGE. Der blaue Pfeil kennzeichnet die Bromphenolblau-Lauffront.

Weiterhin ist zu bedenken, dass die Proteine an ihrem pI die geringste Löslichkeit besitzen. Nach erfolgter Trennung in der ersten Dimension sind die Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt aufkonzentriert. An diesem Punkt ist die Nettoladung der Proteine Null, wodurch keine elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den Proteinen mehr stattfinden. Sie können dann sehr leicht aggregieren und in Folge dessen im IPG-Streifen präzipitieren. Das Anfärben der verwendeten IPG-Streifen zeigte jedoch, dass sich keine weiteren Proteinreste auf diesen befanden. Die Elution der Proteine vom IPG-Streifen scheint also nicht das Problem zu sein, sondern die Migration der Proteine in das SDS-Gel. Letzteres könnte durch eine Erhöhung der

SDS-Konzentration im Äquilibrationpuffer verbessert werden. Im Folgenden wurden die SDS-Konzentrationen von 2% der Ursprungsmethode auf 3%, 5% und 8% erhöht. Die prozentualen relativen Standardabweichungen RSD% wurden nach Gleichung 24 für jede SDS-Konzentration berechnet, um so die Streuungen zwischen den verschiedenen Konzentrationen zu vergleichen.

Vergleicht man die RSD%-Werte der unterschiedlichen SDS-Konzentrationen miteinander (Tabelle 3-3), wird deutlich, dass durch eine Erhöhung der SDS-Konzentration im Äquilibrationpuffer die Reproduzierbarkeit nicht verbessert werden konnte. Die optimale SDS-Konzentration, mit der die beste Präzision erreicht werden kann, liegt im Bereich zwischen 2% und 3%.

Tabelle 3-3: Berechnete RSD%-Werte bei verschiedenen SDS-Konzentrationen des Äquilibrationpuffers.

SDS-Konzentration	2 %	3 %	5 %	8 %
Anzahl n der Gele	8	9	8	5
RSD%	40,4 %	40,0 %	61,3 %	58,3 %

Die Gesamtstreuung für jede SDS-Konzentration, wie sie in Tabelle 3-3 angegeben ist, wurde als gepoolte Varianz, die sich aus den einzelnen RSD%-Werten der acht im Gel auftretenden Spots errechnet, dargestellt. Die RSD%-Werte jedes einzelnen Proteins wurden zunächst quadriert, um die Varianzen für jedes Protein zu berechnen. Die acht Varianzen der acht Proteine derselben SDS-Konzentration wurden anschließend nach Gleichung 31 zu der gepoolten Varianz $\hat{\sigma}_{\text{pooled}}^2$ zusammengefasst, dabei steht $\hat{\sigma}_m^2$ für die Varianz jedes einzelnen Proteins, n für die Anzahl der untersuchten Gele und m für die Anzahl der betrachteten Proteine.

$$\hat{\sigma}_{\text{pooled}}^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot \hat{\sigma}_1^2 + (n_2 - 1) \cdot \hat{\sigma}_2^2 + \dots + (n_m - 1) \cdot \hat{\sigma}_m^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_m - m} \quad (\text{Gleichung 31})$$

Die Trennung von Proteinen mit extremen Eigenschaften, wie z.B. sehr basische oder saure Proteine, extrem hydrophobe Proteine oder besonders große Proteine, ist aufgrund von Aggregation, Oxidation und Präzipitation immer wieder mit großen Schwierigkeiten verbunden, wie bei McDonough und Marbàn [70] beschrieben. Dies kann zu einem Verlust dieser Proteine während verschiedener Phasen der Gelelektrophorese führen. Das Ausmaß dieses Proteinverlustes haben verschiedene Arbeitsgruppen [71, 72] untersucht. Zou und Speicher [72] berichten über einen großen Proteinverlust von 8 - 10% während des Äquilibrationsschrittes. Die Untersuchungen von Zhou et al. [71] zeigen, dass sogar 17-24% der Proteine sich im Puffer während der Äquilibration lösen und somit für die Elektrophorese nicht mehr zur Verfügung stehen.

Bei der Migration vom ersten Gel (IPG-Streifen) auf das zweite Gel (SDS-Gel) müssen die Proteine verschiedene Grenzflächen überwinden, vom IPG-Streifen zunächst ins Agarosegel und von dort anschließend ins Polyacrylamidgel. Das Löslichkeitsverhalten bei hoher Ausgangskonzentration der Proteine ist in all diesen Medien sehr unterschiedlich, was den Transfer von dem einen ins nächste Medium erschwert. Somit kann es an diesen Grenzflächen sehr leicht zur Ausfällung der Proteine kommen, wodurch ein quantitativer Transfer auf das Polyacrylamidgel nicht mehr gewährleistet ist. Damit ist nicht nur das Lösen der Proteine im Probenpuffer zu Beginn der Elektrophorese, sondern auch der Transport der Protein-SDS-Komplexe auf das 2D-Gel eine große Herausforderung.

Eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit kann erreicht werden, indem die Proteine während der gesamten Elektrophorese optimal in Lösung gehalten werden. Dem Verlust der Proteine durch Aggregation, Oxidation und somit Präzipitation während des Äquilibrationsschrittes muss vorgebeugt werden. Hierfür sind verschiedene Lösungsansätze denkbar. So könnten Modifikationen des Äquilibrationspuffers oder Optimierung des pH-Wertes zur Stabilisierung der Proteinlösung führen. Durch den Einsatz von Tensiden oder Polyolen könnte das Löslichkeitsverhalten der Proteine verbessert werden. Der Verlust der Proteine während der Elektrophorese stellt jedoch nur eine nachrangige Fehlerquelle dar, die die Gesamtstreuung nur in geringem Maße beeinflusst. Solange die Hauptfehlerquellen nicht identifiziert wurden, die aufgrund des Fehlerfortpflanzungsgesetzes die Gesamtstreuung

dominieren, macht es keinen Sinn, diese nachrangigen Fehlerquellen zu reduzieren, da sie weiterhin von den Hauptfehlerquellen überdeckt werden.

3.5 Scan-zu-Scan Variabilität

Für eine weitere Analyse und Quantifizierung müssen die angefärbten Gele zunächst eingescannt werden. Diese aufgenommenen, digitalisierten Gelbilder können dann mit einer geeigneten Software weiter untersucht und bewertet werden. Der Scanvorgang selbst könnte einen Anteil zum Gesamtfehler beitragen. Dieser Einfluss auf die Reproduzierbarkeit wurde im Folgenden untersucht, indem jedes Gel dreimal eingescannt wurde, und die Proteinspots der aufgenommenen Gelbilder mit der 2D-Software PROTEOMWAVER™ quantifiziert wurden. Die Untersuchung der Spotintensitäten führte zu relativen Standardabweichungen von 1% bis 9% RSD%. Dabei war kein Zusammenhang zwischen den RSD%-Werten und der Spotintensität oder dem isoelektrischen Punkt der Proteine zu erkennen. Proteine, die in einem Gel eine gute Präzision zeigten, verhielten sich in einem anderen Gel wieder komplett anders. Somit hängt die Präzision nicht von den Proteineigenschaften ab, sondern von der Beschaffenheit des Geles. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Arbeiten von Mahon und Dupree [44], die unter anderem auch die Scan-zu-Scan Variabilität untersuchten und Streuungen zwischen 1% und 10% für alle Spotintensitäten beobachteten. Auch die Arbeit von Challapalli et al. [45] beschreibt eine solche technische Streuung des wiederholten Scannens.

3.6 Hintergrundsignal

Für die Untersuchung des Hintergrundsignals, welches aus der Anfärbung der Gelmatrix resultiert, wurden die Coomassie Blue Silver Färbung nach Candiano et al. [69], eine modifizierte Neuhoffs kolloidale Coomassie Färbung, und die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO verwendet. Allerdings wurde letzterer Farbstoff nicht als gebrauchsfertige Lösung eingesetzt, sondern der Farbstoff (kurz: RuBPS) wurde im Vorfeld nach Rabilloud et al. [68] selbst synthetisiert.

Die getrennten Proteine wurden zunächst mit dem Fluoreszenz-Farbstoff und anschließend mit der Coomassie Blue Silver Färbung angefärbt. Änderungen im Färbeprotokoll [68, 69] wurden durchgeführt und deren Einfluss auf die Farbtintensität der Spots, die abhängig von dem Gehalt des Proteins ist, auf die der Gelmatrix und daraus folgend auf die quantitative Bestimmung untersucht. Veränderungen der Volumina der Färbe- und Entfärbelösungen nahmen keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit. Führt man jedoch die komplette Färbeprozedur zweimal hintereinander durch, so führt dies bei der RuBPS-Färbung zu einer deutlichen Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Spotintensitäten, aber nicht bei der Coomassie Silver Färbung. Abbildung 3-2 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Aufgetragen sind die errechneten RSD%-Werte gegen die isoelektrischen Punkte der entsprechenden Proteine beider Färbemethoden. Die Farbtintensität der Proteinspots konnte bei der Fluoreszenz-Färbung deutlich erhöht werden, ohne den Gelhintergrund stärker anzufärben. Bei der Coomassie Silver Färbung wurden jedoch im Gegensatz zur RuBPS-Färbung nicht nur intensivere Spots sondern auch eine stärkere Färbung der Gelmatrix beobachtet. Besonders in den Bereichen in der Nähe der Spots war eine starke Hintergrundfärbung zu erkennen, was eine korrekte Bestimmung der Spotgrenzen erschwerte.

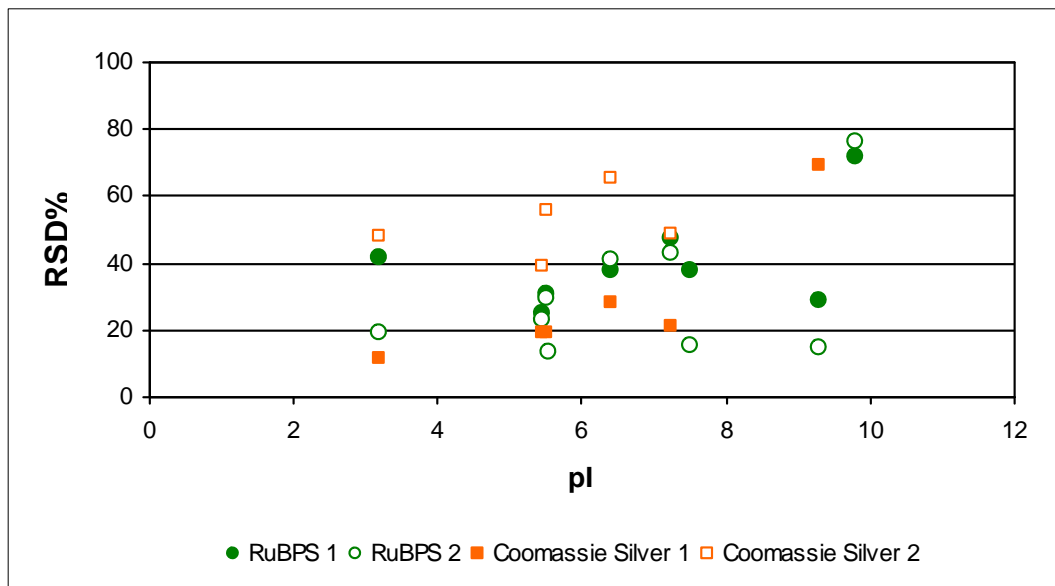


Abbildung 3-2: Vergleich der Streuungen der verschiedenen Färbungen (RuBPS und Coomassie Blue Silver). Dargestellt sind die errechneten RSD%-Werte (aus $n = 19$ Gelen) und den pI der Proteine zugeordnet. Die „1“ kennzeichnet die Durchführung der einfachen, die „2“ die Durchführung der wiederholten Färbe- und Entfärbeprozedur.

Die zusätzliche, störende Färbung der Gelmatrix ist ein bekanntes Problem bei allen Detektionsmethoden, die auf Farbstoffen beruhen. Um das Ausmaß dieser Gelhintergrundfärbung genauer abzuschätzen, wurden die dreidimensionalen Gelbilder um eine Dimension reduziert und so in zweidimensionale Elektropherogramme konvertiert. Untersucht und verglichen wurden RuBPS-gefärbte 1D- und 2D-Gele der gleichen Charge, d.h. alle Gele wurden in einem Schritt gegossen, die gleiche Probe und das gleiche Probenvolumen wurden aufgetragen. Weiterhin wurden dieselben Reagenzien, wie Puffer und Färbelösungen verwendet, alle Arbeiten wurden parallel und alle Versuche unter identischen elektrophoretischen Bedingungen durchgeführt. Nach der Färbung wurden den einzelnen Grauwerten der digitalisierten Gelbilder mit Hilfe von MATLAB Zahlen zugeordnet. Die Gelbilder bzw. die erhaltene Zahlenmatrix wurde in kleinere Untereinheiten aufgeteilt, die 1D-Gele bahnenweise und die 2D-Gele in einen oberen und einen unteren Bereich. Spalte für Spalte wurden anschließend die Zahlenwerte aufsummiert, wodurch aus dem Gelbild nun ein Elektropherogramm entstand. Auf diese Weise wurden alle Bereiche, die tatsächlich zu einem Spot gehörten, auch wirklich miterfasst. Beispielelektropherogramme und die zugehörigen Gelausschnitte zeigen die Abbildung 3-3 (Vergleich der Bahnen zweier 1D Gele) und die Abbildung 3-4 (Vergleich der oberen Gelbereiche zweier 2D Gele). Die so entstandenen Gele wurden mit der Software KISS (Korrektes Integrations-Software System) [73] integriert. KISS ist eine Integrationssoftware, die im Arbeitskreis entwickelt wurde und standardmäßig zur Auswertung aller anfallenden Daten verwendet wird. Der Integrationsalgorithmus beruht auf einer kubischen Splinefunktion.

Die Elektropherogramme verdeutlichen die starken Schwankungen der Gelhintergrundfärbung, die sich in der stark schwankenden Basislinie äußern. Große Unterschiede in den Basislinien innerhalb eines Geles, aber auch besonders zwischen den Gelen, machen eine genaue Definition der Peakgrenzen extrem schwierig und führen somit zu großen Unterschieden bei der Peakflächenbestimmung, was sich in der schlechten Präzision widerspiegelt. Der Basislinienverlauf ist von den Peaks gar nicht mehr unterscheidbar. Dies ist zum einen schon in den konvertierten 1D-Gelen (Abbildung 3-3) erkennbar, wird aber noch wesentlich deutlicher in den Elektropherogrammen der 2D-Gele (Abbildung 3-4). Das

Problem der verschiedenen Hintergrundfärbungen zwischen den Gelen ist schon lange bekannt, aber dass es in solch einem Ausmaß vorliegt, war nicht zu erwarten. Keine Auswertesoftware ist in der Lage, solche Unterschiede zu korrigieren. Eigentlich sollten in dem oberen Bereich des 2D-Geles vier Peaks auftauchen, da sich hier auch vier Proteine im Gelbild befinden: Pepsin, Glucoseoxidase, Albumin und Catalase. Es lassen sich jedoch nur zwei Proteine, Glucoseoxidase und Albumin, eindeutig den Peaks zuordnen. Im Gegensatz dazu verschwinden die Peaks für Pepsin und Catalase im Verlauf der Basislinie und können somit nicht mehr detektiert werden.

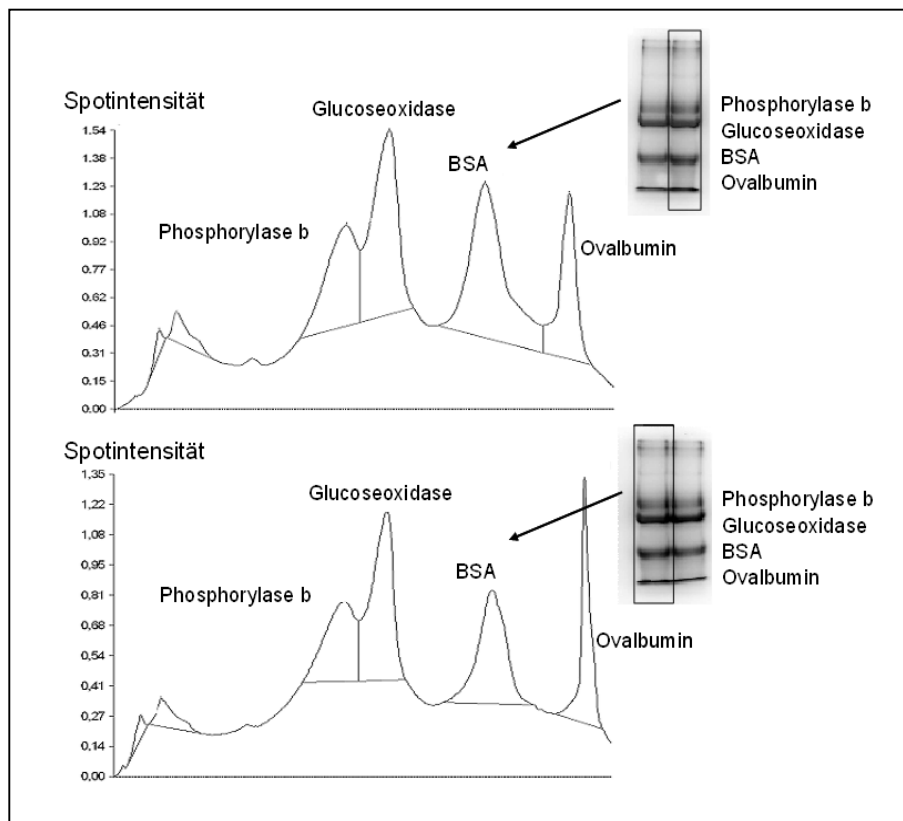


Abbildung 3-3: Vergleich zweier 1D-Gelbilder und der entsprechenden Elektropherogramme. Der Gelbereich, der in das Elektropherogramm umgewandelt wurde, ist mit dem Kasten markiert.

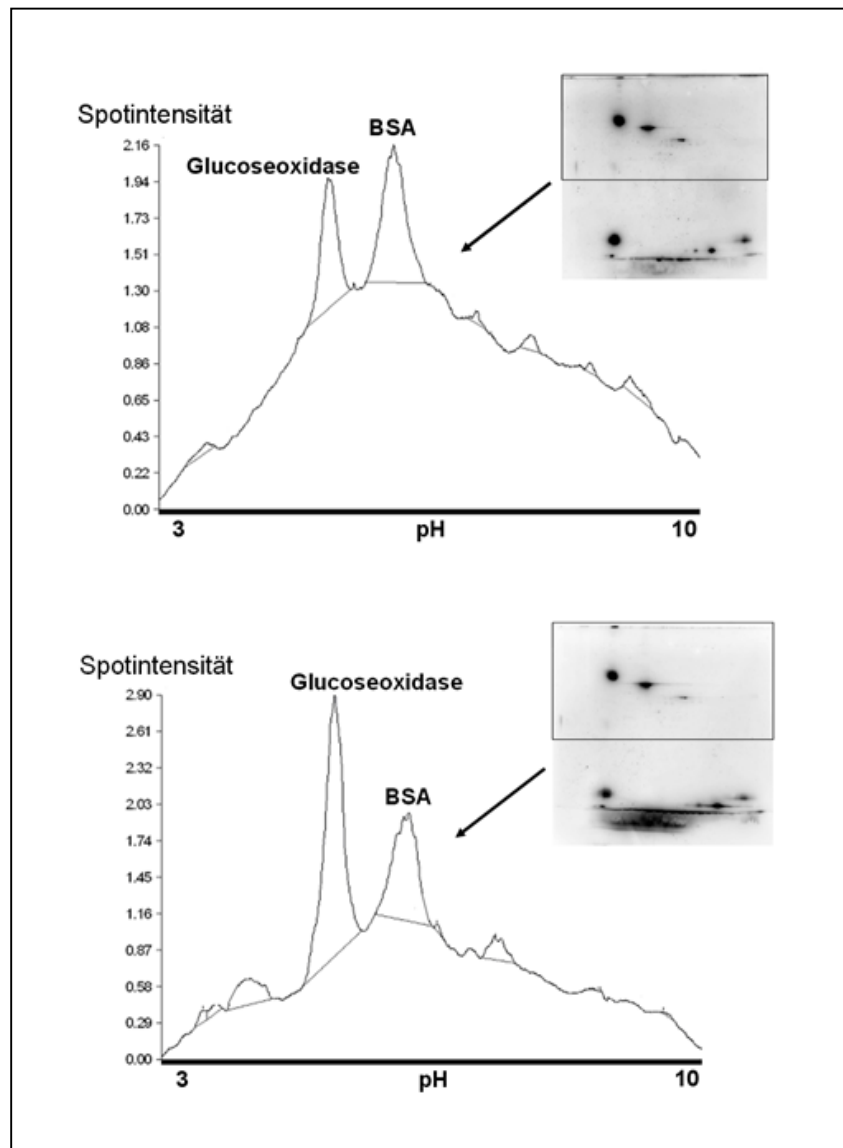


Abbildung 3-4: Vergleich zweier 2D-Gele, die mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (RuBPS) angefärbt wurden, und die zugehöriger Elektropherogramme. Dargestellt ist jeweils der obere Teil des Gels, der mit der Markierung versehen ist.

Weiterhin wurde untersucht, ob diese Hintergrundschwankung tatsächlich in der Färbung begründet ist oder vielleicht sogar durch das Gel selbst verursacht wird. Dazu wurden Gele, ohne Probe, direkt nach dem Gießen und Gele, mit denen der komplette elektrophoretische Prozess einschließlich dem Färbeschritt durchgeführt wurde, eingescannt und konvertiert. Frisch gegossene Gele zeigen auch schon kleine Schwankungen im Gelhintergrund, die aber durch die Färbung deutlich verstärkt wurden.

3.7 Analytiker

Die komplexe Technik der 2D-Gelelektrophorese erfordert sehr viel Übung und Erfahrung, um optimale Gelbilder zu produzieren. Der direkte Vergleich von Gelen derselben Probe, die einmal von einer geübten Person und einmal von einer ungeübten Person hergestellt wurden, verdeutlicht diese Problematik. Jeder Analytiker fertigte acht Gele, auf denen jeweils eine komplexe Gewebeprobe aus Mäusegehirnen aufgetrennt wurde. Diese Gele wurden von der Arbeitsgruppe Zabel der Charité Berlin zur Verfügung gestellt [74].

Die Proteinextrakte wurden über einen pH-Bereich von pH 3,5 - 9,0 in der ersten Dimension und anschließend auf 40 cm x 30 cm x 0,9 mm großen SDS-Gelen in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die Detektion der getrennten Proteine erfolgte mit einer sauren Silberfärbung [74-76]. Zur Bewertung wurden die Gele in fünf pH-Gruppen unterteilt und insgesamt 114 Spots ausgewählt, die in beiden Gelgruppen gut erkennbar waren und sich leicht zuordnen ließen. Die schlechtere Gelqualität der Gele, die von der ungeübten Person angefertigt wurden, wird schon durch einen visuellen Vergleich beider Gelgruppen deutlich (Abbildung 3-5).

Die Ergebnisse eines direkten Spot-zu-Spot Vergleichs sind in Abbildung 3-6 dargestellt. Für jeden Spot aus dem pH-Bereich pH 3,5 – 4,5 wurde die relative prozentuale Standardabweichung RSD% berechnet, um so die Streuungen des geübten und des ungeübten Analytikers miteinander zu vergleichen. In diesem pH-Bereich wurden 22 Spots untersucht und nach aufsteigender Spotintensität in der Grafik dargestellt. Der Spot mit der Nummer 1 repräsentiert somit den Spot mit der geringsten Spotintensität, der mit der Nummer 22 den mit der höchsten Intensität. Die RSD%-Werte kleinerer Spots (geringere Spotintensität), die von dem ungeübten Analytiker gefertigt wurden, sind immer signifikant höher als die RSD%-Werte des geübten Analytikers. Ab einer gewissen Spotintensität, hier ab Spot-Nummer 17, ist der Unterschied in der Präzision jedoch nicht mehr so ausgeprägt. Allerdings befinden sich im gesamten Gel nur sehr wenige Spots mit einer so hohen Spotintensität.

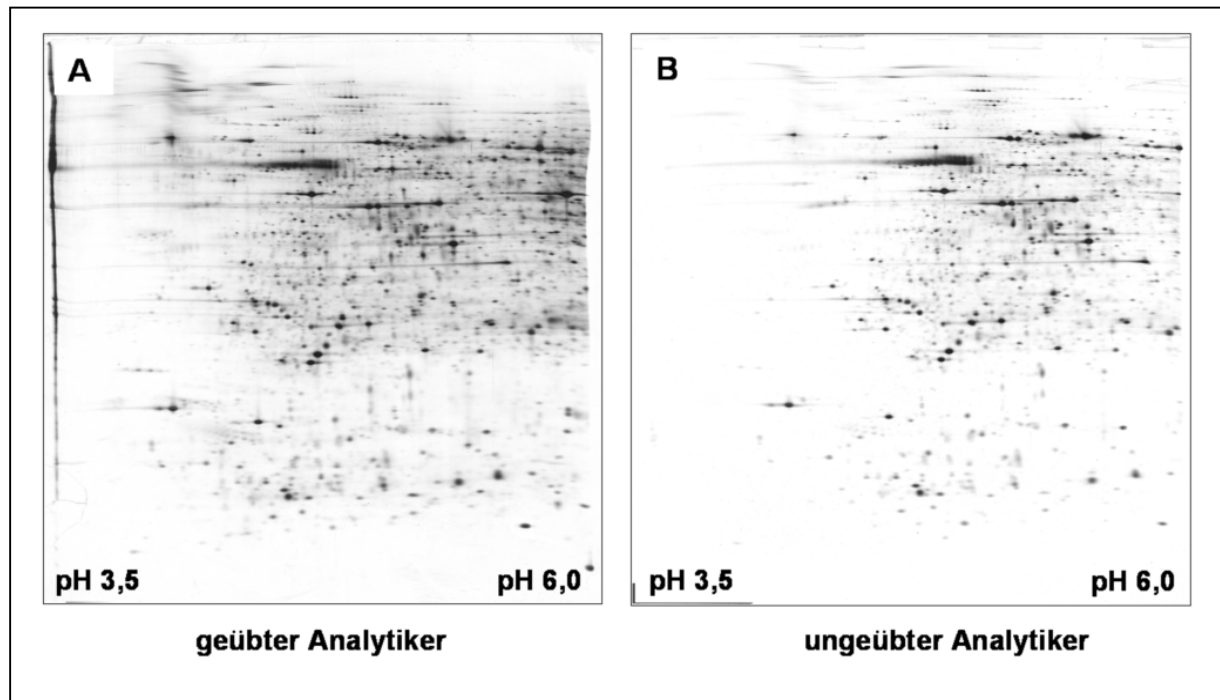


Abbildung 3-5: Vergleich zweier 2D-Gelausschnitte, die von einem geübten Analytiker (A) und von einem ungeübten Analytiker (B) angefertigt wurden. Aufgetrennt wurde ein Proteinextrakt eines Mäusegehirns. Die Proteine wurden mit einer sauren Silberfärbung detektiert [74].

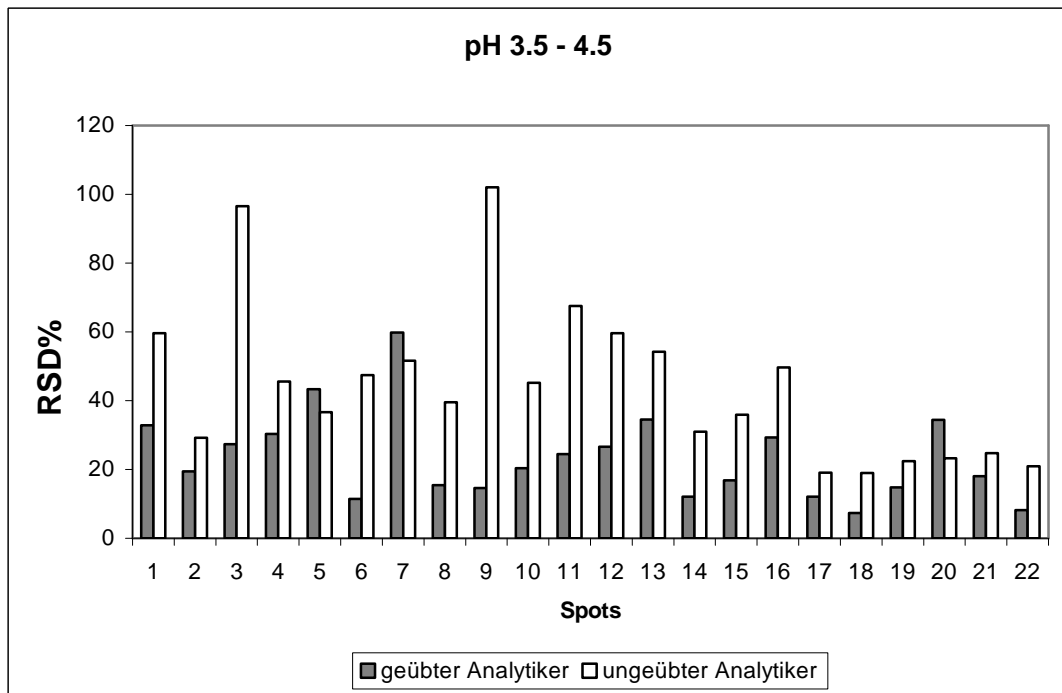


Abbildung 3-6: Vergleich der errechneten RSD%-Werte des geübten und des ungeübten Analytikers für die betrachteten Spots im pH-Bereich pH 3,5 – 4,5. Spot-Nr. 1 repräsentiert den Spot mit der geringsten Intensität, Spot-Nr. 22 den mit der höchsten in diesem Bereich.

Zur Bestätigung der unterschiedlichen Gelqualitäten wurde zusätzlich ein F-Test (vgl. Kap. 1.3.1) durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Gesamtvarianz jeder pH-Gruppe berechnet und anschließend ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Varianzen mit Hilfe des F-Testes überprüft.

Folgende Nullhypothese wurde aufgestellt und überprüft: „Die Varianzen beider Analytiker unterscheiden sich nicht signifikant“ ($H_0: \hat{\sigma}_1^2 = \hat{\sigma}_2^2$, wobei $\hat{\sigma}_1^2$ die Varianz des geübten Analytikers und $\hat{\sigma}_2^2$ die Varianz des ungeübten Analytikers darstellt). Folglich heißt die Alternativhypothese: „Die Varianzen beider Analytiker unterscheiden sich signifikant“ ($H_1: \hat{\sigma}_1^2 \neq \hat{\sigma}_2^2$).

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Ergebnisse des F-Tests. Die F_{krit} -Werte wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ berechnet.

pH-Bereich	Anzahl n der Spots	F_0	F_{krit}	F-Test	Ergebnis
3,5 – 4,5	23	2,486	2,048	$F_0 > F$	signifikanter Unterschied; Annahme der Alternativhypothese $H_1: \hat{\sigma}_1^2 \neq \hat{\sigma}_2^2$
4,5 – 5,5	35	32,722	1,772	$F_0 > F$	signifikanter Unterschied; Annahme der Alternativhypothese $H_1: \hat{\sigma}_1^2 \neq \hat{\sigma}_2^2$
5,5 – 6,5	21	1,084	2,124	$F_0 < F$	kein signifikanter Unterschied; Annahme der Nullhypothese $H_0: \hat{\sigma}_1^2 = \hat{\sigma}_2^2$
6,5 – 7,5	22	3,855	2,084	$F_0 > F$	signifikanter Unterschied; Annahme der Alternativhypothese $H_1: \hat{\sigma}_1^2 \neq \hat{\sigma}_2^2$
7,5 – 9,0	13	4,815	2,687	$F_0 > F$	signifikanter Unterschied; Annahme der Alternativhypothese $H_1: \hat{\sigma}_1^2 \neq \hat{\sigma}_2^2$

Die Ergebnisse des F-Testes (Tabelle 3-4) zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den Varianzen des geübten und des ungeübten Analytikers. In allen pH-Bereichen außer bei pH 5,5 – 6,5 lehnt der F-Test die Nullhypothese ab. In diesem Fall (pH 5,5 - 6,5) macht sich aber wahrscheinlich die Schwäche des F-Testes bemerkbar: Das Risiko, einen β -Fehler einzugehen, d.h. das Risiko einen signifikanten Unterschied zwischen den Streuungen beider Analytiker nicht als solchen zu erkennen. Also kann auch in diesem Fall, trotz Annahme der Nullhypothese, davon ausgegangen werden, dass ein statistisch signifikanter Unterschied vorliegt. Diese Untersuchungen bestätigen somit die Aussagen von Challapalli et al. [45], dass ein ungeübter Analytiker mit wenig Erfahrung in der Durchführung der 2D-Gelelektrophorese große Schwierigkeiten hat, reproduzierbare Gele herzustellen.

3.8 Zusammenfassung

Die Hauptfehlerquellen, die die große Streuung in der quantitativen 2-DE verursachen, und ihr Anteil, den sie zu der Gesamtstreuung beitragen, sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst. Der Anteil an der Gesamtstreuung wurde durch Poolen der relativen Standardabweichungen abgeschätzt.

Tabelle 3-5: Fehlerquellen in der 2-DE und ihr abgeschätzter Anteil an die Gesamtstreuung, angegeben als prozentuale relative Standardabweichung RSD%.

Gesamtstreuung in der quantitativen 2-DE	13 – 60% [41-44]
<u>Hauptfehlerquellen:</u> <ul style="list-style-type: none">• Detektionsmethode / Färbemethode• Transfer der Proteine von der ersten auf die zweite Dimension• Analytiker	13 – 70% 10 – 15% 10%
<u>nachrangige Fehlerquellen:</u> Probenaufarbeitung, Einscannen, Verlust der Proteine im Äquilibrationpuffer	< 10%

Die Hauptfehlerquelle stellt die Visualisierung, d.h. die Detektion der getrennten Proteine, dar. Es ist schwierig, die optimalen Färbebedingungen zu finden, mit denen sich die Proteine ausreichend anfärben und der Gelhintergrund zufriedenstellend entfärben lässt. Starke Schwankungen in der Basislinie, bedingt durch die stark schwankende Gelhintergrundfärbung, erschweren das Festlegen der richtigen Spotgrenzen und somit die Detektion der Proteine. Als direkte Folge sind eine schlechte Empfindlichkeit sowie schlechte Reproduzierbarkeit zu beobachten. Durch Wiederholen des kompletten Färbeprotokolls der RuBPS-Färbung konnte eine Verbesserung in der Reproduzierbarkeit erreicht werden, dadurch verlängert sich jedoch die ohnehin schon extrem lange Analysezeit noch einmal erheblich, was somit für die Routineanalyse keine Alternative darstellt.

Aufgrund des Fehlerfortpflanzungsgesetzes dominiert die Hauptfehlerquelle die Gesamtstreuung. Eine Analyse weiterer nachrangiger Fehlerquellen, die nur einen geringen Einfluss auf die Gesamtstreuung ausüben, können dann erst identifiziert werden, wenn die Hauptfehlerquelle beseitigt worden ist und somit die kleineren Fehlerquellen nicht mehr länger überdeckt. Die Verbesserung der Präzision der quantitativen Gelelektrophorese ist dadurch ein Prozess, der schrittweise verlaufen muss.

Neben der Proteindetektion wurde auch der Transfer der Proteine von der ersten auf die zweite Dimension als eine Hauptfehlerquelle identifiziert. Eine genauere Untersuchung und Verbesserung dieses Arbeitsschrittes sowie die Optimierung des Äquilibrationsschrittes, um den Verlust der Proteine in dieser Phase der 2-DE zu verhindern, ist jedoch erst dann sinnvoll, wenn ein geeignetes Detektionssystem gefunden wurde, welches den Gesamtfehler deutlich reduziert.

Die durch den Analytiker verursachte Streuung zieht sich durch alle Arbeitsschritte der 2-DE. Durch sehr viel Übung und Erfahrung in der Durchführung der 2-DE kann diese Hauptfehlerquelle minimiert und die Präzision verbessert werden.

4 Detektion

Im vorangehenden Kapitel wurde die Visualisierung der getrennten Proteine mit Hilfe von Färbemethoden bzw. die daraus resultierende stark schwankende Gelhintergrundfärbung als Hauptfehlerquelle und Ursache für die unzureichende Präzision identifiziert. Eine deutliche Verbesserung der Präzision könnte somit durch eine Detektionsmethode erreicht werden, die so ein starkes Hintergrundsignal nicht verursacht. Daher wurden im Folgenden zwei weitere, neue Detektionsmethoden genauer analysiert.

4.1 Native Fluoreszenz

4.1.1 Prinzip der Detektion

Die meisten Proteine enthalten aromatische Aminosäuren, wie Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin. Diese Aminosäuren zeigen eine signifikante UV-Absorption zwischen 250 und 300 nm und fluoreszieren zwischen 300 und 400 nm (Tabelle 4-1). Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um die Proteine direkt mittels UV-Absorption oder mittels ihrer Nativen Fluoreszenz zu detektieren. Die Arbeitsgruppe um Ed Yeung [77-79] nutzte die Eigenschaft der Nativen Fluoreszenz zur direkten Detektion der getrennten Proteine im Gel. Dies ist eine sehr empfindliche Methode, bei der die langen An- und Entfärbeschritte und die damit verbundenen Schwierigkeiten entfallen.

Tabelle 4-1: Fluoreszenzeigenschaften von aromatischen Aminosäuren. Angabe für wässrige Lösungen bei pH = 7 und 25 °C aus [2].

Aminosäure	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]
Tryptophan	285	360
Tyrosin	275	310
Phenylalanin	260	283

4.1.2 Experimenteller Aufbau

Der experimentelle Aufbau, der zur Detektion der Proteine mittels ihrer Nativen Fluoreszenz benötigt wird, ist in Abbildung 4-1 skizziert. Die Anregung erfolgt über einen Laser. Der Laserstrahl wird über ein System bestehend aus verschiedenen Linsen und Spiegeln aufgeweitet. Dieser aufgefächerte Laserstrahl trifft von der Seite auf das Gel, wodurch die im Gel getrennten Proteine angeregt werden. Anschließend wird die von den Proteinen emittierte Fluoreszenz mit einer Kamera detektiert.

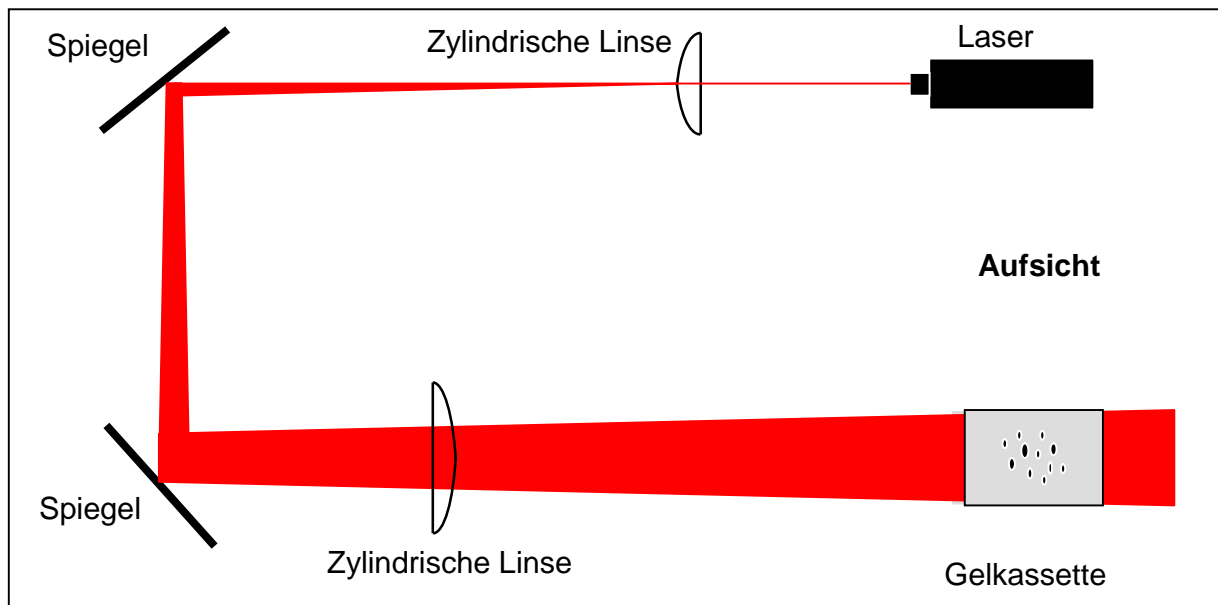


Abbildung 4-1: Experimenteller Aufbau zur Proteindetektion mittels Nativer Fluoreszenz in der Aufsicht.

4.1.3 Native Fluoreszenz von 1D-Gelen

Von der Arbeitsgruppe Yeung von der Iowa State University wurden 1D-Gele, die mittels Nativer Fluoreszenz detektiert wurden, für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Auf diesen Gelen wurde ein Proteingemisch bestehend aus sechs Proteinen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Gelbilder wie unter 3.6 beschrieben um eine Dimension reduziert und in Elektropherogramme umgewandelt. Solch ein mittels Nativer Fluoreszenz detektiertes Gelbild und das

zugehörige Elektropherogramm des Lysozyms sind in Abbildung 4-2 dargestellt. Im Gelbild ist der Bereich, der konvertiert wurde, mit einem Kasten markiert. Somit zeigt das Elektropherogramm Lysozym in fünf verschiedenen Konzentrationen.

In der Basislinie dieses Elektropherogramms ist auch eine leichte Schwankung zu erkennen, die aber keineswegs so stark ausgeprägt ist wie in den fluoreszenzgefärbten Gelen, die in Kapitel 3 dargestellt sind. Im Vergleich zu der Fluoreszenzfärbung sind hier gut definierte Peaks detektiert, die einfach zu integrieren sind. Diese Verbesserung führt zu einem dreifach besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis, obwohl im Fall der Nativen Fluoreszenz die Probe in einer 800-fach geringeren Konzentration eingesetzt wurde. Der Trend der Basislinie kann zum einen in der unterschiedlichen Gelbeschaffenheit begründet sein, oder, was wesentlich wahrscheinlicher ist, in der abnehmenden Intensität des Laserstrahls beim Durchtritt durch das Gel.

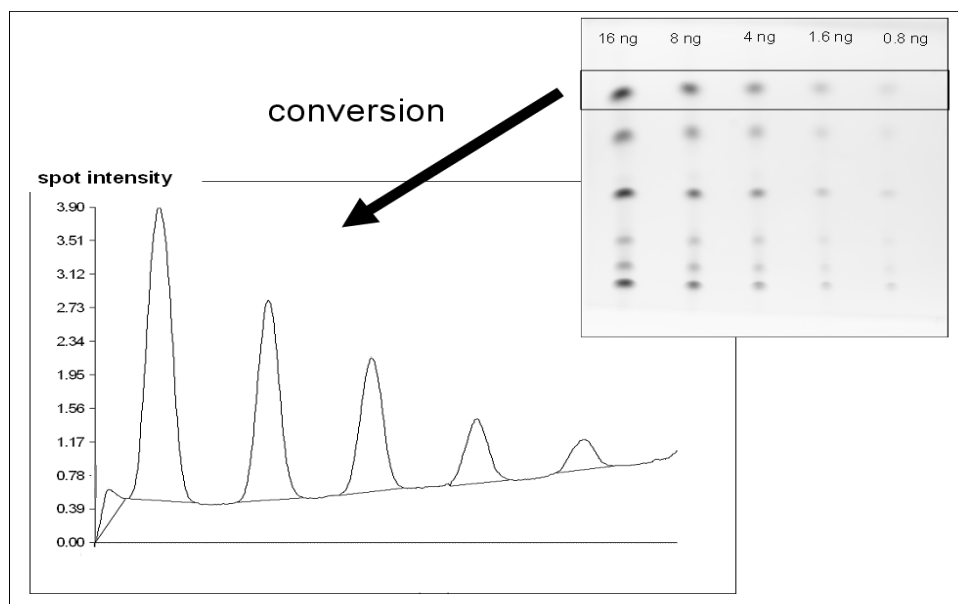


Abbildung 4-2: 1D-Gelbild nach der Detektion mit Nativer Fluoreszenz. Der Gelausschnitt, der Lysozym in fünf verschiedenen Konzentrationen enthält (hier mit dem Kasten markiert), wurde in ein Elektropherogramm umgewandelt.

Zur Bestimmung der quantitativen Reproduzierbarkeit standen leider keine Gele zur Verfügung, auf denen dasselbe Probenvolumen mehrfach aufgetragen wurde. Daher

wurden mit Hilfe einer Linearen Regression die Streumaße der Regressionsgeraden bestimmt, um so Rückschlüsse auf die Präzision zu ziehen. Neben der Präzision konnte auf diese Weise auch gleich die Linearität überprüft werden.

Zwei Gele, die sechs Proteine in verschiedenen Konzentrationen enthielten, wurden für die Untersuchungen der Linearen Regression herangezogen. Dabei wurden folgende Konzentrationen für jedes Protein betrachtet: 0,8 ng, 1,6 ng, 4,0 ng und 8,0 ng. Abbildung 4-3 zeigt exemplarisch die betrachteten Peakflächen in Abhängigkeit von den Proteingehältern für Lysozym beider untersuchten Gele. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Gele sind in verschiedenen Farben dargestellt. Aus diesen Daten wurde eine Regressionsgerade ermittelt, die ebenfalls in Abbildung 4-3 eingezeichnet wurde. Alle Proteine wurden zusätzlich in einer Konzentration von 16 ng, wie es auch im Gelbild der Abbildung 4-2 zu sehen ist, aufgetragen. Die Ermittlung der Peakfläche des zweiten Geles zeigte jedoch bei allen Proteinen eine große Abweichung von den Peakflächen des ersten Geles, so dass hier von einem Injektionsfehler ausgegangen wurde, und daher diese Konzentration nicht weiter betrachtet wurde.

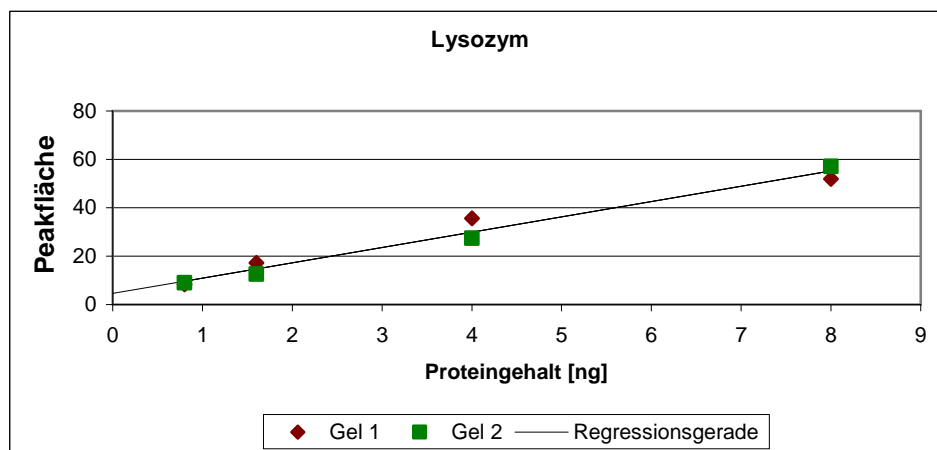


Abbildung 4-3: Lineare Regression am Beispiel von Lysozym zur Überprüfung der Linearität und Präzision bei der Detektion von Proteinen mittels ihrer Nativen Fluoreszenz. Untersucht wurden zwei Gele, auf denen jeweils 0,8 ng, 1,6 ng, 4,0 ng und 8,0 ng des entsprechenden Proteins aufgetragen wurden.

Die Regressionsgerade ist eine Ausgleichsgerade, die den linearen Zusammenhang zwischen den Peakflächen bzw. Spotintensitäten und dem aufgetragenen Proteinkonzentrationen bestätigt. Die Varianz als Streumaß um die Gerade wird nach Gleichung 32, aus der Differenz der Einzelwerte y_i zur Regressionsgeraden $\hat{y}(x_i)$ ermittelt [39].

$$\hat{\sigma}^2(y) = \frac{\sum (y_i - \hat{y}(x_i))^2}{n-2} \quad (\text{Gleichung 32})$$

Zu beachten ist, dass die Anzahl der Freiheitsgrade in allen Fällen, die mit der Linearen Regression in Verbindung stehen, aus der Datenzahl minus zwei errechnet wird, da bei der Ermittlung der Geraden zwei Lageparameter, nämlich der Achsenabschnitt und die Steigung, aus den Rohdaten bestimmt wurden.

Die Standardabweichung um die Gerade errechnet sich auch in diesem Fall durch Ziehen der Quadratwurzel aus der Varianz (Gleichung 33). Zur Ermittlung der Geradenstandardabweichung wird stillschweigend angenommen, dass sie in allen Punkten der Gerade gleich ist [39]. Dies entspricht sicher nicht der Realität, gibt jedoch zunächst einen guten Überblick über die Präzision.

$$\hat{\sigma}(y) = \sqrt{\hat{\sigma}^2(y)} \quad (\text{Gleichung 33})$$

Aus der Streuung um die Regressionsgerade können relative Standardabweichungen von 12 – 16% RSD% bezogen auf die Gesamtpeakflächen für die einzelnen Proteine berechnet werden. Diese Untersuchungen zeigen, dass durch Ausnutzung der Nativen Fluoreszenz zur Detektion der Proteine eine deutliche Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses sowie der Peakform und somit der Präzision erzielt werden kann. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Ergebnisse der Linearen Regression der sechs untersuchten Proteine, die mit ihrer Nativen Fluoreszenz detektiert wurden.

Protein	M _r [kDa]	pI	Peakfläche	$\hat{\sigma}$	RSD%
Lysozym	14,4	11,7	27,397	3,3	12,0 %
Trypsin Inhibitor	21,5	4,5	17,283	2,6	14,8 %
Carboanhydrase	31,0	6,0	19,814	3,2	16,0 %
Ovalbumin	45,0	5,1	7,442	1,0	13,3 %
BSA	66,2	4,8	7,365	1,1	14,3 %
Phosphorylase B	97,0	6,8	12,557	2,0	15,6 %

Aus den Elektropherogrammen kann für jedes Protein das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bestimmt werden, woraus die Detektionsgrenze (DL) als Maß für die Empfindlichkeit der Detektionsmethode abgeschätzt werden kann. Aufgrund des sehr guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses zeigt die Detektion mittels Nativer Fluoreszenz neben der guten Präzision auch eine wesentlich höhere Empfindlichkeit als die in Kapitel 3 vorgestellten Detektionsmethoden. Die aus den Elektropherogrammen abgeschätzte DL bzw. die geringste Konzentration, die noch detektiert werden kann, beträgt ca. 0,3 ng für die Detektion mittels Nativer Fluoreszenz.

Ein Prototyp zur Detektion von Proteinen aufgrund ihrer Nativen Fluoreszenz wurde von Zhang [78] entwickelt. In Anlehnung an diese Arbeit sollte diese vielversprechende Detektionsmethode umgesetzt werden, um sie weiterzuentwickeln und zu optimieren.

4.1.4 Umsetzung des experimentellen Aufbaus zur Nativen Fluoreszenz-Detektion

Die Gelgrößen, die in der klassischen 1D- und 2D-Gelelektrophorese eingesetzt werden, sind allerdings nicht zur Detektion mittels Nativer Fluoreszenz geeignet, sie sind zu groß. Die Leistung des Lasers reicht nicht aus, um das komplette Gel auszuleuchten, stattdessen wird die Laserleistung vom Gel „geschluckt“ d.h. stark gedämpft, so dass die Intensität des Laserstrahls nach Eintritt in das Gel relativ

schnell abnimmt. Zur Abstimmung des experimentellen Aufbaus und des Lasers wurden daher zunächst große Gele in ca. 2 x 2 cm große Gelstücke zerschnitten. Doch die Umsetzung der Laserdetektion mit diesen Gelstücken brachte neue Schwierigkeiten mit sich. Durch das Zerschneiden der großen Gele war es besonders schwierig, kleine Gelstücke mit geraden Gelkanten zu produzieren. Das Laserlicht wurde an diesen schiefen Kanten gebrochen und gestreut, wodurch eine Detektion der Proteine nicht mehr möglich war. Daher wurden aus Plexiglas kleine Gelkammern gefertigt, mit denen Mikrogele der Größe 2 cm x 2 cm x 1 mm gegossen werden konnten. Abbildung 4-4 zeigt eine solche Gelgießkammer und ein solches Mikrogel, das ungefähr so groß wie eine 1€ Münze ist. Aus Eppendorfpipettenspitzen wurde ein Kamm gefertigt, mit dessen Hilfe die Probentaschen im Gel geformt wurden. Die aus Teflon hergestellte, horizontale Laufkammer ist in Abbildung 4-5 zu sehen.

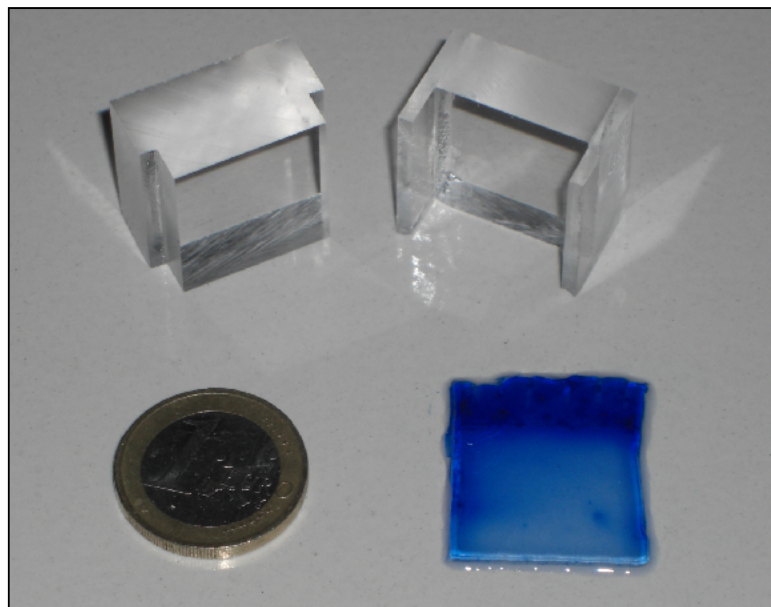


Abbildung 4-4: Mikrogelkammer und Mikrogel, welches mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt wurde. Das Gel besteht aus einem Sammel- (der obere, dunkelblaue Bereich) und einem Trenngel (der untere, hellblaue Bereich).

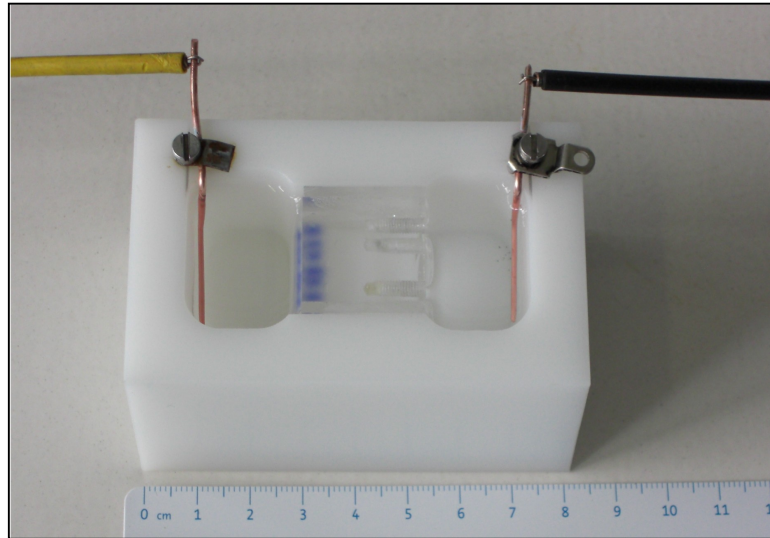


Abbildung 4-5: Horizontale Laufkammer für Mikrogele.

4.1.5 Elektrophoretische Bedingungen für die Mikrogele

Zur Abstimmung der optimalen elektrophoretischen Bedingungen für dieses neue System wurden für die Trennung zunächst verschiedene Spannungen getestet. Normalerweise wird der Probelösung ein Farbstoff, z.B. Bromphenolblau, hinzugefügt, um so die Laufront während der Elektrophorese zu markieren und um das Ende der Elektrophorese zu erkennen. Bei der späteren Laserdetektion dürfen jedoch keine Farbstoffe verwendet werden, da diese die emittierte Fluoreszenz der Aminosäuren überdecken könnten. Daher wurde die für jede Spannung benötigte Analysenzeit gestoppt und dokumentiert (Tabelle 4-3).

Insgesamt wurden Spannungen zwischen 50 V und 140 V für die elektrophoretische Trennung getestet. Zur Bewertung wurden die Dauer der Analysenzeit sowie die Trennung und die Spotform der Proteine im Gelbild herangezogen, die mit Hilfe der Coomassie-Färbung nach Kang [80] angefärbt wurden. Als optimale Spannung stellte sich ein Bereich zwischen 65 und 85 V heraus. Bei kleineren Spannungen (< 65 V) war zwar auch noch eine sehr gute Trennung der Proteine zu beobachten, die langen Analysenzeiten sind hierbei allerdings als Nachteil zu nennen. Bei einer Spannung von z.B. 50 V dauert die Elektrophorese 21 Minuten.

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der angelegten Spannungen und benötigten Analysenzeiten.

angelegte Spannung [V]	50	55	60	65	70	75	80	85
Zeit [Min]	21	15	15	13	11	10	9	8
angelegte Spannung [V]	90	95	100	105	110	120	140	
Zeit [Min]	8	7	6	6	5	5	abgebrochen → Überhitzung	

Ab einer angelegten Spannung von 90 V beginnt sich die Trennung deutlich zu verschlechtern. Die einzelnen Proteinspots sind nicht mehr eindeutig als solche zu erkennen, stattdessen entsteht eine langgezogene Proteinbahn. Weiterhin wurde beobachtet, dass bei höheren Spannungen sich der Puffer sehr schnell erwärmt und ab 120 V sogar nach kurzer Zeit zu sieden beginnt, was zu Veränderungen der Proteinstruktur, also zur Denaturierung führen kann. In Abbildung 4-6 sind exemplarisch drei verschiedene Gelbilder, aus den verschiedenen Spannungsbereichen (zu geringer Spannungs- (< 65V), optimaler Spannungs- (65 - 85 V) und zu hoher Spannungsbereich (> 85 V)), dargestellt.

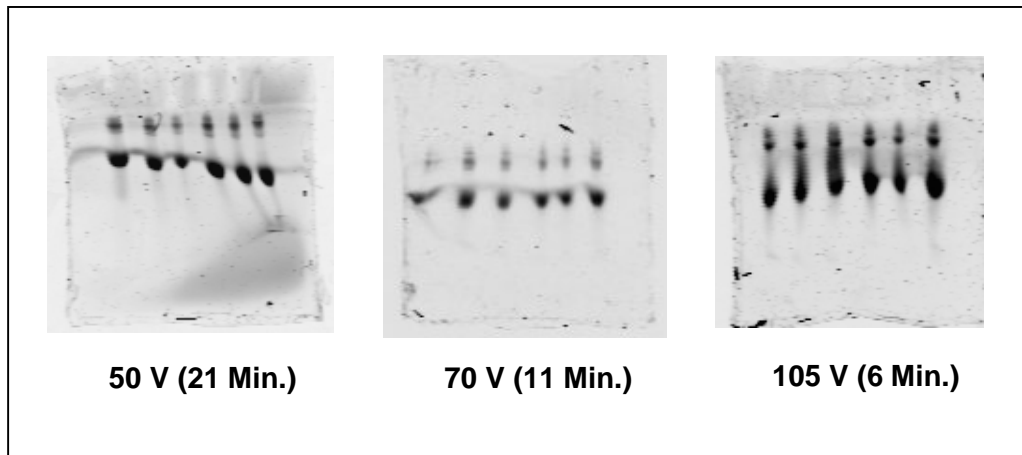


Abbildung 4-6: Vergleich dreier Mikrogele. Aufgetragen wurden hier jeweils 0,5 μ L einer BSA-haltigen Probelösung, die bei verschiedenen Spannungen aufgetrennt wurde.

4.1.6 Abstimmungen für die Laserdetektion

Nach Ermittlung der optimalen elektrophoretischen Bedingungen sollte im folgenden Schritt der experimentelle Aufbau zur Proteindetektion auf den Mikrogele abgestimmt werden. Dazu wurden zunächst zwei verschiedene Proteinlösungen (BSA und Carboanhydrase), in denen die Proteine in verschiedenen Konzentrationen enthalten waren, auf die Mikrogele aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V über einen Zeitraum von 9 Minuten. Da den Probelösungen in diesem Fall kein Bromphenolblau zugesetzt wurde, fehlte eine direkte Kontrolle beim Probenauftrag und während der Elektrophorese. Somit wurden einige Gele stichprobenartig ausgewählt und mit der Coomassie-Färbung nach Kang angefärbt, um auf diese Weise zu kontrollieren, ob die angestrebte elektrophoretische Trennung stattgefunden hat. Für die Detektion wurde ein Nd-YAG-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 266 nm verwendet.

Die Detektion der ersten Gele lieferte vielversprechende Ergebnisse. Die Gele, die mit BSA beladen wurden, zeigten deutliche Spots. Abbildung 4-7 zeigt einen solchen BSA-Spot (1,59 μ g BSA). Die Intensität dieses Spots sowie das gute Signal-zu-Rausch Verhältnis ließen den Schluss zu, dass die Proteinkonzentration noch wesentlich verringert werden konnte. Die mit Carboanhydrase beladenen Gele

lieferten allerdings nicht so intensive Spots und gute S/N-Verhältnisse. Daher wurden für die weitere Optimierung nur BSA-haltige Probelösungen eingesetzt.

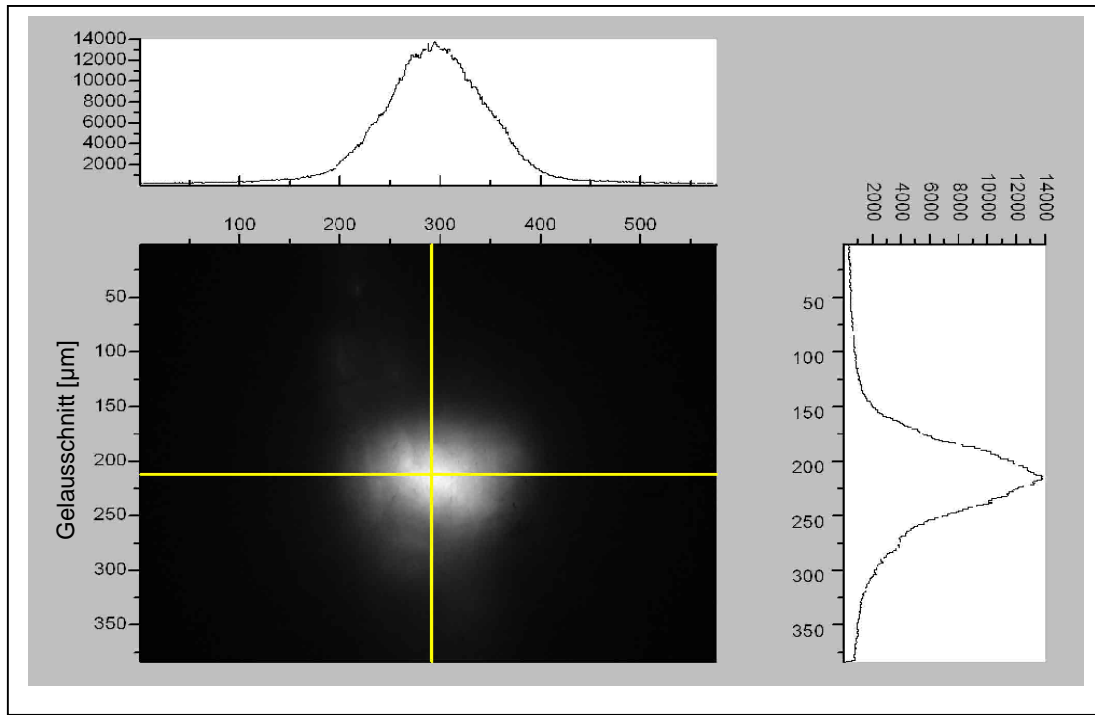


Abbildung 4-7: Ein mittels Nativer Fluoreszenz detektierter Gelausschnitt. Dieser Proteinspot entspricht 1,59 μg Albumin.

In einem nächsten Schritt sollten nun die DL und QL für die Albumindetektion mittels Nativer Fluoreszenz bestimmt werden. Es wurden verschiedene Albuminkonzentrationen von 0,2 μg – 1,6 μg auf die Mikrogele aufgetragen, allerdings konnten dieses Mal, unerklärlicherweise, keiner dieser Spots detektiert werden, auch nicht die in den ersten Versuchen detektierbare Albuminmenge von 1,6 μg . Eine Anfärbung dieser Gele mit der Coomassie-Färbung nach Kang zeigte jedoch in allen Gelen das Vorhandensein deutlicher Proteinspots. Eine genaue Analyse der Elektrophorese sowie der Laserdetektion sollte nun Aufschluss über die fehlende Detektierbarkeit geben.

Im Probenpuffer, der zur Herstellung der Proteinlösung verwendet wurde, sowie im verwendeten Gel, könnten Bestandteile enthalten sein, die die Native Fluoreszenz der Proteine beeinflussen bzw. verhindern. Zur Abstimmung der elektrophoretischen

Bedingungen wurden in der Laufkammer auch immer wieder Gele entwickelt, die Bromphenolblauzusätze enthielten. Möglicherweise beeinflussten Reste dieses Farbstoffes, die noch in der Laufkammer zurückgeblieben waren, die anschließende Native Detektion. Eine weitere Überlegung war, dass sich während der Elektrophorese Substanzen, wie z.B. Weichmacher o.ä., aus dem Material der Laufkammer herausgelöst haben, die die Detektion der Proteine verhindern. Daher wurden alle während der Elektrophorese verwendeten Substanzen spektrometrisch vermessen.

Abbildung 4-8 zeigt die aufgenommenen Emissionsspektren des Polyacrylamidgeles, der Proteinlösung (BSA gelöst im Probenpuffer) sowie einer Bromphenolblaulösung (Bromphenolblau gelöst im Probenpuffer). Die Peaks, die bei ca. 266 nm und ca. 535 nm auftauchen, stammen vom Anregungslicht und beeinflussen die Emissionsmessung nicht weiter. Die dargestellten Kurven sind jedoch keineswegs quantitativ vergleichbar, da zum einen die vermessene Substanzmenge nicht der Situation im präparierten Gel entspricht, und zum anderen die Empfindlichkeit des Detektors an die zu vermessende Probe immer wieder neu angepasst werden musste. Die Vermessung diente lediglich dazu, herauszufinden, wo die Emissionsmaxima der einzelnen, für die Elektrophorese notwendigen Substanzen liegen, um so auszuschließen, dass diese die Native Fluoreszenz der Proteine beeinflussen.

Das Gel selbst (in Abbildung 4-8 blau dargestellt) zeigt eine signifikante Emission im Bereich der Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren, Bromphenolblau und Probenpuffer (in Abbildung 4-8 gelb dargestellt) stören die Emission aber nicht sonderlich. Um zu analysieren, wie stark die Eigenfluoreszenz des Gels die Native Fluoreszenz-Detektion der Proteine beeinträchtigt, wurden eine Tryptophan-haltige und eine BSA-haltige Probelösung direkt auf ein leeres Gel getropft und die emittierte Native Fluoreszenz gemessen. Sowohl das reine Tryptophan als auch das BSA konnten so detektiert werden. Die Eigenfluoreszenz des Gels beeinflusst nur im geringen Maß die Detektierbarkeit der Proteine, indem es die Detektionsgrenze erhöht, die Detektion aber nicht wesentlich beeinträchtigt.

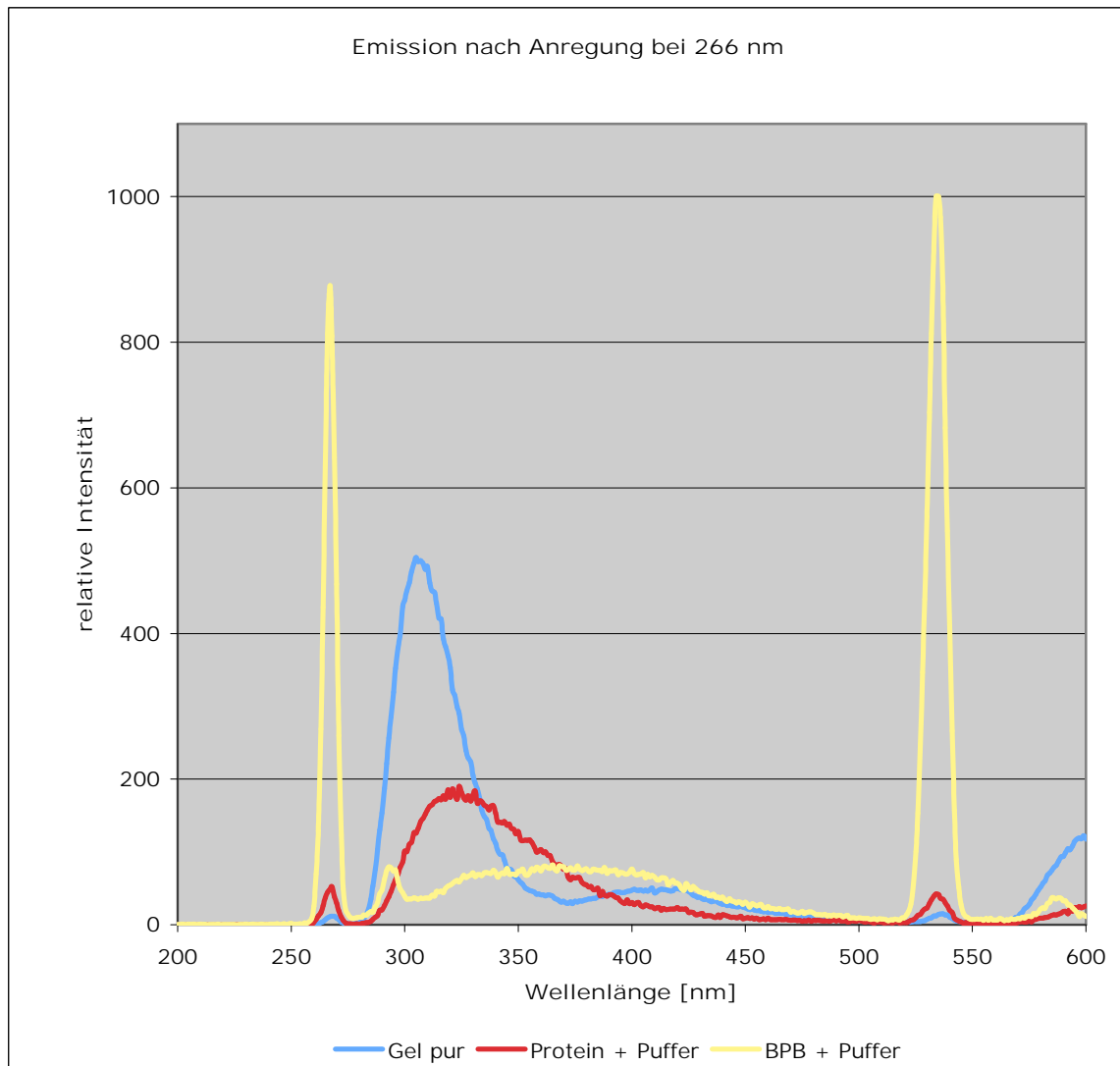


Abbildung 4-8: Emissionsspektren eines Geles, einer Proteinlösung (BSA) sowie einer Bromphenolblaulösung.

In Abbildung 4-9 sind die Emissionsspektren der vermessenen Laufpuffer zu sehen. Es wurde sowohl ein frisch hergestellter Laufpuffer, vor der Elektrophorese, als auch gebrauchte Laufpuffer, die zur Elektrophorese verwendet wurden, vermessen. Im Gegensatz zu dem frisch hergestellten Laufpuffer (in Abbildung 4-9 rot dargestellt) zeigen auch die bereits verwendeten Laufpuffer (in Abbildung 4-8 grün dargestellt) eine geringe Emission im Bereich der aromatischen Aminosäuren, die aber die Detektion der Nativen Fluoreszenz nicht weiter stören sollte.

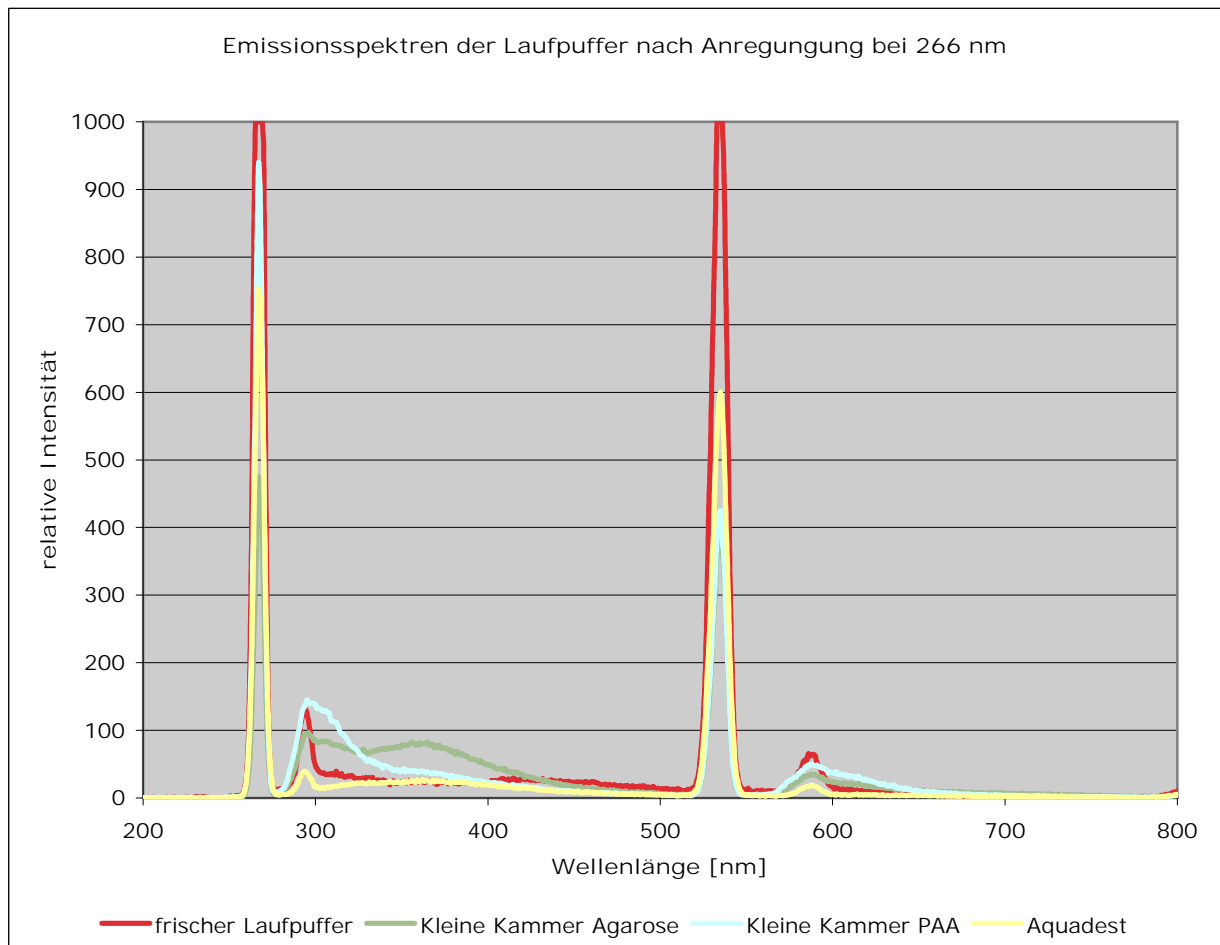


Abbildung 4-9: Emissionsspektren der Laufpuffer, vor und nach der Elektrophorese.

Eine weitere Überlegung war, dass die Laserleistung des zur Detektion verwendeten Lasers zu stark war, so dass dieser die Proteine innerhalb kürzester Zeit so beschädigte, dass ihre Native Fluoreszenz nicht mehr messbar war. Daraufhin wurden verschiedene Laserleistungen, Filter und Belichtungszeiten getestet, die bislang aber noch nicht den gewünschten Erfolg brachten.

4.2 NIR-Imaging System

Der Coomassie-Farbstoff ist aufgrund seiner einfachen Handhabung und der Kompatibilität mit nachgeschalteten Analysenmethoden zur Proteinidentifizierung und -charakterisierung ein sehr beliebter und am häufigsten verwendeter Farbstoff in der Proteindetektion. Durch die Entwicklung der kolloidalen Formulierung des Coomassie-Farbstoffes (Colloidal Coomassie Blue-Farbstoff (CCB)) konnte die störende Hintergrundfärbung des Gels erheblich reduziert und somit die Detektionsgrenze verbessert werden [57], allerdings ist diese immer noch schlechter als die der Silber- oder Fluoreszenz-Färbung.

Die Verwendung eines Imaging-Systems anstelle der konventionellen Densitometer, welches die emittierte Fluoreszenz der angefärbten und angeregten Proteine im Fernen-Rot- und Nahen-Infrarot-Wellenlängenbereich (Wellenlängen von 700 bis 900 nm) detektiert, verspricht eine deutlich empfindlichere Detektionsmethode [54, 81, 82] zu sein.

Das Odyssey Near-Infrared Imaging System der Firma LiCor (Lincoln, NE, USA) nutzt die Fluoreszenzemission der angeregten Proteine im Nahen-Infrarot-Wellenlängenbereich zur Detektion [83] der getrennten Proteine. Zwei unabhängige Laser und Detektoren ermöglichen die gleichzeitige Detektion zweier Fluoreszenzsignale. Die Anregungswellenlängen dieser Diodenlaser liegen bei 685 nm (700 nm-Kanal) und bei 785 nm (800 nm-Kanal).

CCB-gefärbte 1D-Gelen wurde mit Hilfe des Odyssey Infrared Imaging System detektiert. Die Empfindlichkeit dieses Detektors wurde anschließend anhand der digitalisierten Gelbilder bzw. Elektropherogramme mit zwei weiteren Detektoren verglichen.

4.2.1 Vorteile der NIR-Detektion

Durch Absorption der Lichtenergie wird das Elektronensystem eines Moleküls angeregt. Bei der Rückkehr der Elektronen aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand kann die Elektronenanregungsenergie in Lichtenergie umgewandelt werden, die dann in Form von Fluoreszenzlicht emittiert wird. Die Lichtabsorption hängt größtenteils von der Wellenlänge der angeregten Lichtquelle ab, mit zunehmender Wellenlänge nimmt sie zu. Bei Wellenlängen, die kleiner als 700 nm (UV-Vis-Bereich) sind, dringt das Licht nur wenige Millimeter in das Untersuchungsmaterial ein und verursacht eine Autofluoreszenz des Untersuchungsmaterials. Oberhalb von 700 nm ist der Absorptionskoeffizient wesentlich geringer. Daher kann Fernes-Rot- und Nahes-Infrarot-Licht (engl.: near-infrared, NIR) viel tiefer in das Untersuchungsmaterial eindringen und erreicht sogar eine Eindringtiefe von mehreren Zentimetern. Dies resultiert in einer geringeren Autofluoreszenz der Probesubstanz [84, 85].

Durch die Detektion im NIR-Wellenlängenbereich wird die Autofluoreszenz von biologischen Materialien (Zellen, Gewebe), Arzneimittelverbindungen und Plastikware (z.B. Mikrotiterplatten) extrem verringert, was zu einer Verbesserung des Singal-zu-Rausch-Verhältnisses führt. Wellenlängen ab 800 nm besitzen eine hohe Eindringtiefe in das Untersuchungsmaterial (über 2 cm). Weiterhin ist von Vorteil, dass die Energie der verwendeten Anregungswellenlängen im NIR-Bereich niedriger und die Expositionszeit sehr kurz sind, wodurch die Probe während der Detektion sehr schonend behandelt wird. Dies spielt besonders bei der Untersuchung von lebenden Zellen eine wichtige Rolle, da diese sowohl durch eine hohe Anregungsenergie als auch durch lange Expositionszeiten beschädigt werden können [85].

4.2.2 Leistungsfähigkeit des Odyssey Imaging Systems

Der Coomassie-Farbstoff gehört zur Gruppe der Triphenylmethanfarbstoffe. Die Struktur dieses Farbstoffes zeigt Abbildung 4-10. In Abbildung 4-11 ist zu erkennen, dass das UV-Spektrum einer wässrigen Coomassie-Lösung zwei Maxima besitzt,

eins bei 285 nm und eins bei 585 nm. Der 700 nm-Kanal (Anregungswellenlänge bei 685 nm) des Odyssey NIR Imaging Systems kann somit zur Detektion der Coomassie-gefärbten Gele verwendet werden.

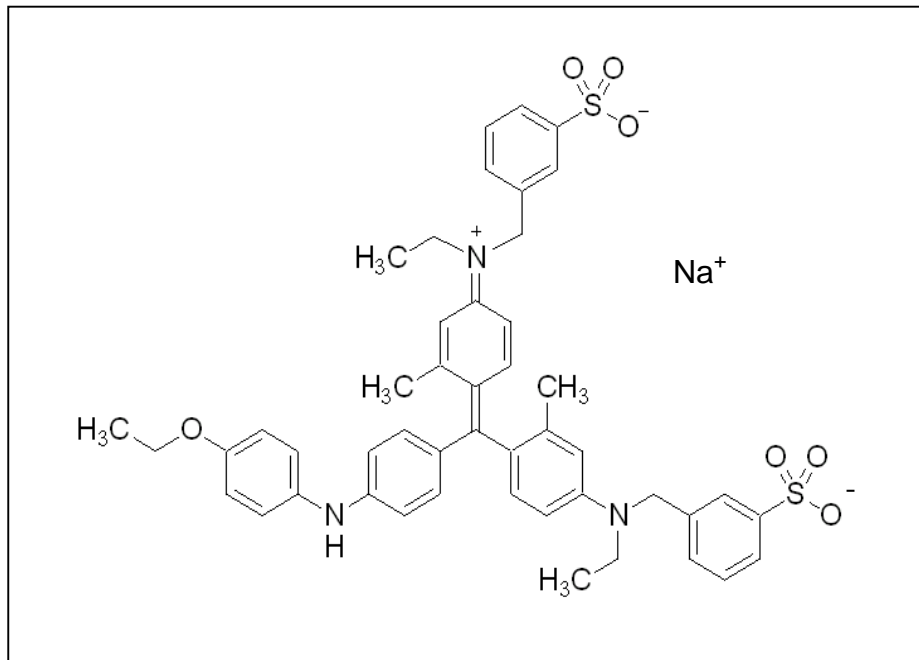


Abbildung 4-10: Struktur des Coomassie-Farbstoffes (M_r von 845,99 g/mol [9]).

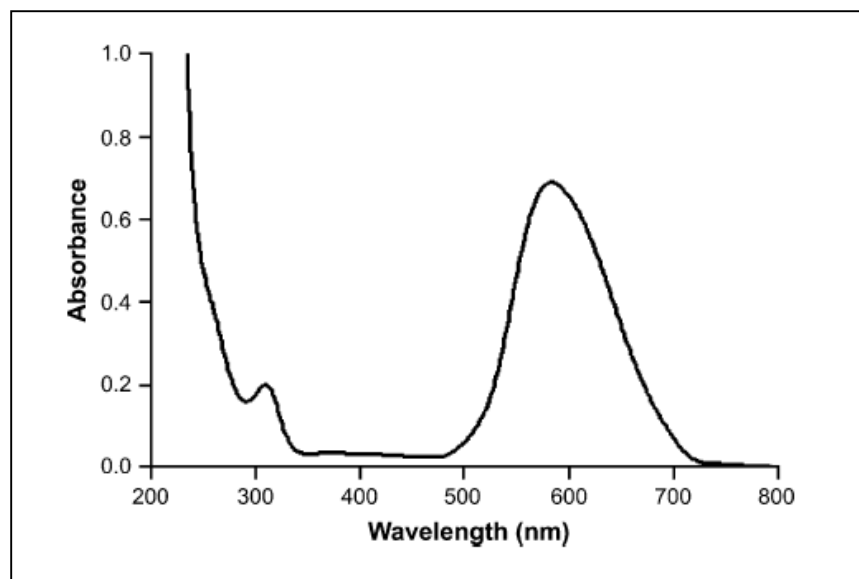


Abbildung 4-11: UV-Vis-Spektrum des Coomassie-Farbstoffes; aus [86].

Neben dem Odyssey Imaging System wurden zwei weitere Scanner zur Detektion der CCB-gefärbten Gele verwendet. Alle digitalisierten Gelbilder wurden anschließend, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, um eine Dimension reduziert und in Elektropherogramme umgewandelt. Zur Bewertung der Leistungsfähigkeit des NIR-Detektors wurden die Detektionsgrenze, Reproduzierbarkeit und Linearität aus den entsprechenden Elektrophrogrammen ermittelt und anschließend mit den weiteren Detektoren verglichen.

Neben dem Odyssey Detektor kamen der Typhoon Fluoreszenz-Detektor (GE Healthcare) sowie der Imagescanner-II (GE Healthcare) zum Einsatz. Der Typhoon-Detektor misst ebenfalls die emittierte Fluoreszenz der angeregten Proteine, allerdings bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm. Zusätzlich kann bei der Messung mit dem Typhoon noch ein Emissionsfilter zwischengeschaltet werden, dessen Verwendung aber keinen Einfluss auf die Qualität der Messsignale gezeigt hat. Der Imagescanner-II dagegen ist ein klassischer Scanner, der über eine Farbdichtemessung (Densitometrie) mit Hilfe des sichtbaren Lichtes die angefärbten Proteine detektiert.

Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Proteinstandardlösungen verwendet: (i) Precision Plus ProteinTM, eine vorgefärbte Standardlösung, und (ii) Mark 12TM, eine ungefärbte Standardlösung. Beide Proteinlösungen bestehen aus jeweils zwölf Proteinen, die auf zwei verschiedenen, industriell hergestellten Geltypen, NuPAGE- und Tris-Glycin-Gelen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden.

Abbildung 4-12 zeigt den direkten Vergleich der digitalisierten Gelbilder eines CCB-gefärbten Geles, welches mit den drei verschiedenen Detektoren, dem Odyssey NIR Imager, Typhoon Fluoreszenzscanner und dem Imagescanner-II, aufgenommen wurde. Dargestellt ist hier die ungefärbte Mark 12TM Proteinstandardlösung, die in verschiedenen Konzentrationen (0,2 – 0,7 µg/µL Gesamtproteinkonzentration) aufgetragen wurden. Der Imagescanner-II, der die gefärbten Proteine im sichtbaren Licht detektiert, ist ungeeignet zur Detektion dieser geringen Proteinkonzentrationen und wurde daher für die weiteren Untersuchungen nicht weiter betrachtet.

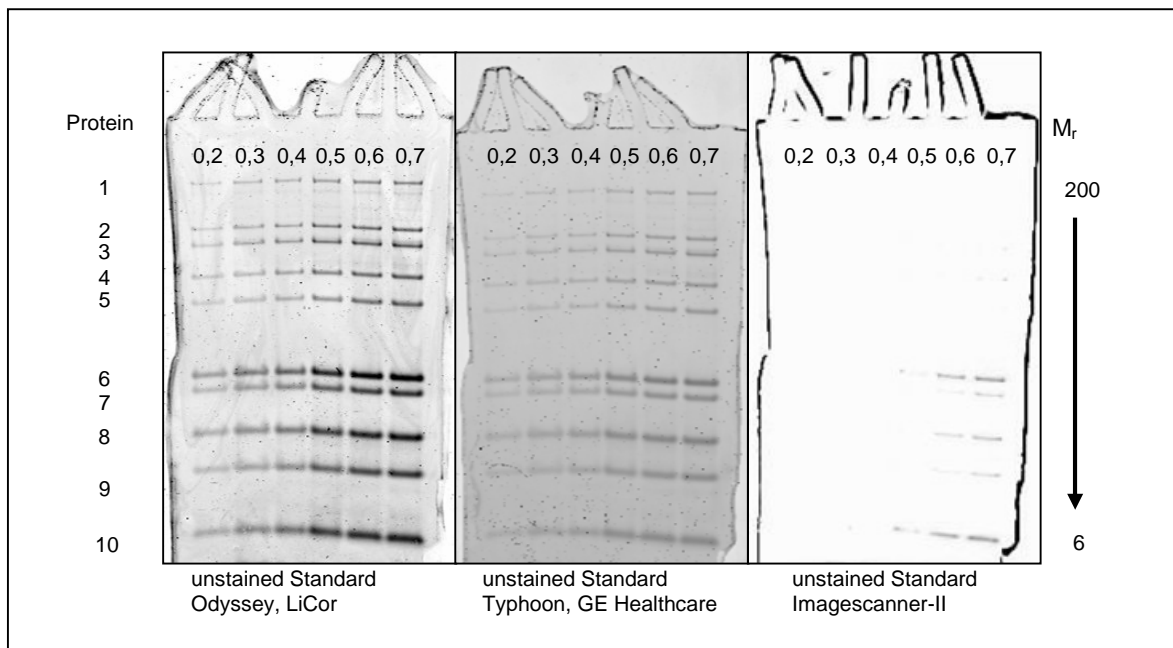


Abbildung 4-12: Direkter Vergleich eines Gelbildes, das mit den drei verschiedenen Detektoren (Odyssey NIR Imager, Typhoon Fluoreszenzscanner und Imagescanner-II) aufgenommen wurde. Aufgetrennt wurde die ungefärbte Mark 12TM Proteinstandardslösung in verschiedenen Proteingesamtkonzentrationen (0,2 – 0,7 µg/µL) auf einem NuPAGE[®] Novex[®] 4 – 12% Bis-Tris-Gel. Die getrennten Proteine wurden anschließend mit der BioSafeTM Coomassie-Färbelösung angefärbt.

Die mit dem Odyssey und Typhoon erhaltenen Gelbilder wurden anschließend Bahn für Bahn in Elektropherogramme umgewandelt. Abbildung 4-13 zeigt einen direkten Vergleich der Bahn, die die Standardlösung in einer Proteingesamtkonzentration von 0,4 µg/µL enthält. Die Elektropherogramme verdeutlichen die auch schon optisch sichtbaren Unterschiede der beiden Gelbildqualitäten. Das Hintergrundrauschen ist bei dem NIR-Imaging System stark reduziert, wodurch die Peaks deutlicher zu erkennen sind. Dies wird besonders im vorderen Bereich der Elektropherogramme deutlich, bei den ersten fünf Peaks. Diese ersten fünf Peaks stehen für die Proteinnummern 1 – 5 (vgl. Tabelle 8-12). Diese Proteine sind im Vergleich zu den letzten fünf Proteinen in einer wesentlich geringeren Konzentrationen in der Standardlösung enthalten. Im Falle des Fluoreszenzscanners ist eine eindeutige Zuordnung dieser ersten fünf Proteine zu den im Elektropherogramm auftretenden Peaks nicht möglich. Stattdessen verschwinden sie im Rauschen der Basislinie. Im Vergleich dazu zeigt das Elektropherogramm, welches mit dem NIR-Detektor

aufgenommen wurde, gut definierte Peaks und ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, wodurch eine eindeutige Zuordnung aller Proteine möglich ist. Aufgrund dieses guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses können noch geringere Konzentrationen mit dem NIR Imager detektiert werden.

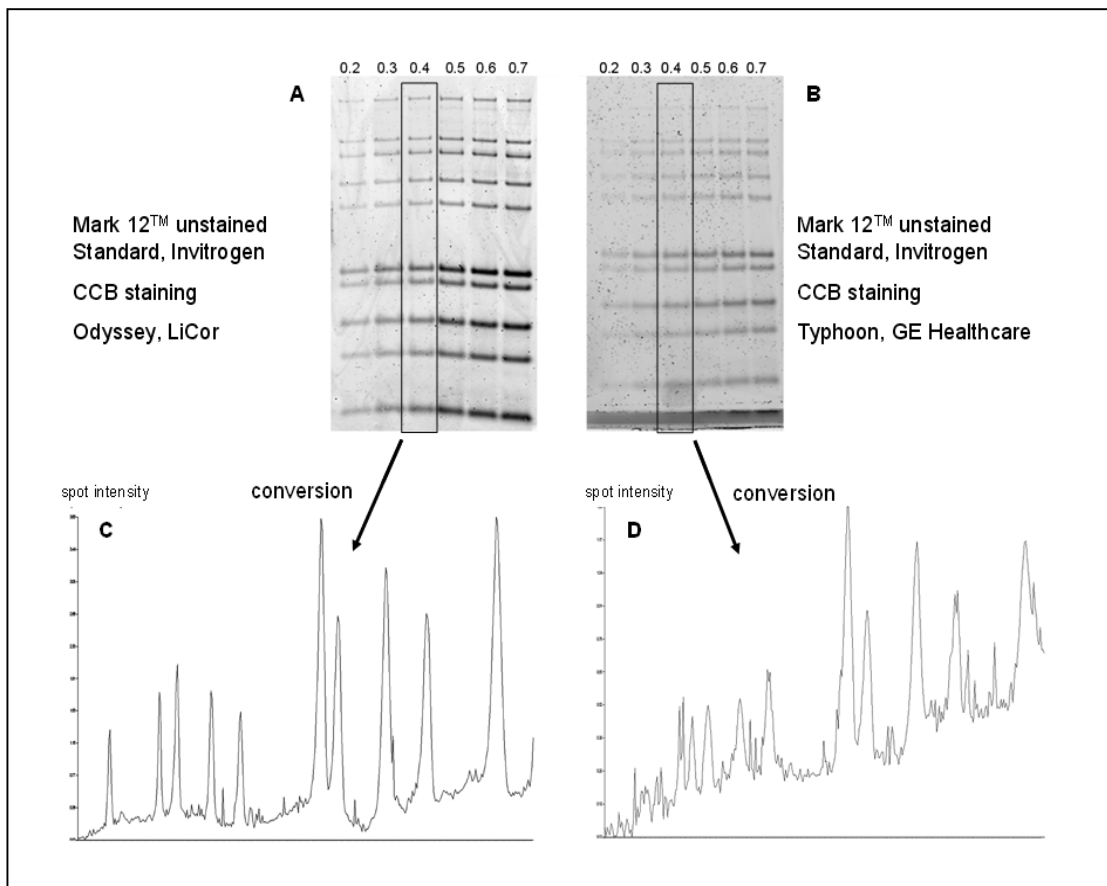


Abbildung 4-13: Direkter Vergleich desselben Gels, welches sowohl mit dem Odyssey Imaging System (A) als auch mit dem Typhoon Fluoreszenz Scanner (B) detektiert wurde. Die Bahn, welche die Standardlösung in einer Proteingesamtkonzentration von 0,4 µg/µL enthält, wurde in Elektropherogramm umgewandelt. Der Vergleich der entstandenen Elektropherogramme ist in den Abschnitten (C) und (D) zu sehen.

Zur Bewertung der Empfindlichkeit wurde aus den Elektropherogrammen über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis die Detektionsgrenzen für jeden Detektor abgeschätzt. Dazu wurde die Signalthöhe für jedes Protein bzw. für jeden Peak und das Rauschen der Basislinie bestimmt, wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben. Anhand des BSA-Peaks, der bei der Detektion mit dem Odyssey Imaging System einer Konzentration von

0,003 µg/µL entspricht, soll die Bestimmung der DL kurz erläutert werden. Die Höhe dieses Peaks beträgt $H = 1,5$ und das Rauschen der Basislinie $h_n = 0,6$. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird nach Gleichung 26 berechnet: $\frac{S}{N} = \frac{2 \cdot H}{h_n} = \frac{2 \cdot 1,5}{0,6} = 5$. Aus

diesem Signal-zu-Rausch-Verhältnis kann nun die DL, d.h. die Substanzkonzentration die noch detektiert werden kann, abgeschätzt werden. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass Signal-zu-Rausch-Verhältnis und Konzentration proportional sind. Die aktuellen Arzneibücher [35, 36] fordern hierfür ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3. Liegt ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 5 bei einer Konzentration von 0,003 µg/µL vor, dann entspricht eine Substanzkonzentration von 0,0018 µg/µL einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 für BSA. Also ist 0,0018 µg/µL die DL für BSA bei diesem angesetzten Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Die Abschätzung der DL zeigt, dass das Odyssey NIR Imaging System die empfindlichere Detektionsmethode darstellt, und bestätigt somit die schon optisch sichtbaren Qualitätsunterschiede zwischen den Gelbildern bzw. den Elektropherogrammen in Abbildung 4-13. Die Signal-zu-Rausch-Verhältnisse und die entsprechenden Proteinkonzentrationen, aus denen die DL abgeschätzt wurden, sind in Tabelle 4-4 exemplarisch für vier Proteine zusammengefasst.

Tabelle 4-4: Signal-zu-Rausch-Verhältnisse und die entsprechenden Proteinkonzentrationen, die zur Abschätzung der Detektionsgrenzen des Odyssey NIR Imaging Systems und des Typhoon Fluoreszenz Scanners herangezogen wurden.

		Odyssey, LiCor		Typhoon, GE Healthcare	
Protein	Mr [kDa]	Konz. [µg/µl]	S/N	Konz. [µg/µl]	S/N
β-Galactosidase	116,3	0,003	3,3	0,005	6,7
Phosphorylase b	97,4	0,005	3,3	0,008	6,7
BSA	66,3	0,003	5,0	0,005	7,7
Glutamatdehydrogenase	55,4	0,008	5,7	0,014	7,0

4.2.3 Präzision

Zunächst wurden verschiedene Proteinkonzentrationen aufgetragen, um die Bestimmungsgrenze (QL) aus dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis für jeden Detektor abzuschätzen. Um die Präzision beider Detektoren miteinander vergleichen zu können, wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen für jeden Detektor verwendet, so dass vergleichbare Signal-zu-Rausch-Verhältnisse ermittelt werden konnten. Für die Untersuchung der quantitativen Reproduzierbarkeit wurden mehrere Gele angefertigt, auf denen die Standardlösung jeweils sechsmal aufgetrennt wurde. Auf diese Weise wurden sowohl Präzision innerhalb eines Geles aber auch die Gel-zu-Gel-Variabilität ermittelt.

Beide Detektoren, sowohl der Odyssey NIR-Detektor als auch der Typhoon Fluoreszenz-Detektor, zeigen eine gute quantitative Reproduzierbarkeit der Peakflächen, was sich in den geringen relativen Standardabweichungen von 3 – 10% RSD% zeigt. Die RSD%-Werte und die zugehörigen Signal-zu-Rausch-Verhältnisse sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst. Diese gute Präzision sowie das gute Signal-zu-Rausch-Verhältnis können jedoch bei dem NIR-Detektor mit wesentlich geringeren Konzentrationen erreicht werden.

Die Detektionsgrenze und die gute Präzision sind unabhängig von den beiden untersuchten Geltypen (NuPAGE und Tris-Bis-Gele). Zwar erhält man in den meisten Fällen mit den Tris-Bis-Gelen ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis, dies führt allerdings nicht zu einer geringeren Detektionsgrenze und zu keiner Verbesserung der Präzision.

4.2.4 Linearität

Neben der Präzision ist die Linearität, die Proportionalität zwischen Probenkonzentration und Messsignal, ein wichtiger, charakteristischer Qualitätsparameter eines Analysenverfahrens. Bei der Bewertung der Zuverlässigkeit einer Quantifizierungsmethode muss dieser Zusammenhang daher immer überprüft werden. Abbildung 4-14 zeigt die linearen Zusammenhänge zwischen den Proteinkonzentrationen und der Spotintensität für die unterschiedlichen Proteine aus

der Mark 12™ Standardlösung nach Detektion mit dem NIR Imager. Die unterschiedlichen Steigungen der Graphen sind in den unterschiedlichen Affinitäten des Coomassie-Farbstoffes zu den einzelnen Proteinen begründet.

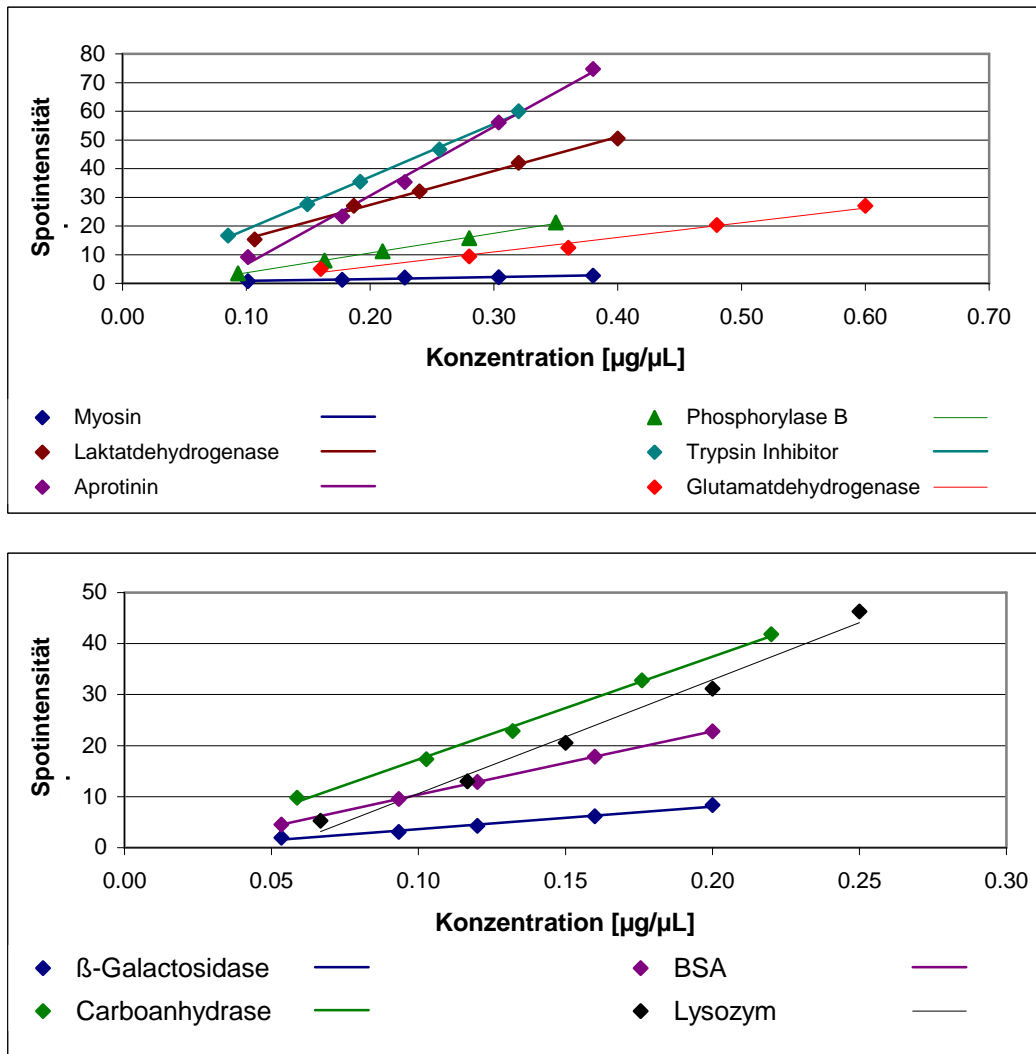


Abbildung 4-14: Linearität der Mark 12™ Proteinstandardlösung.

4.2.5 Vergleich mit Fluoreszenz-Farbstoffen

Eine Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen steht zur Detektion der im Gel getrennten Proteine zur Verfügung, die empfindlicher und selektiver als die kolloidale Coomassie-Färbung sind. Als Nachteile dieser Fluoreszenzfärbungen sind die sehr

teuren Reagenzien, die vielen Arbeitsschritte und langen Analysenzeiten (An- und Entfärbeschritte) sowie die Verwendung verschiedener Lösemittel zu nennen.

Harris et al. [54] untersuchten einige handelsübliche Fluoreszenzfarbstoffe und verglichen die Spotintensitäten sowie die Anzahl der detektierten Spots nach Trennung einer Probe in einem 2D-Gel. All diese Farbstoffe detektierten eine vergleichbare Anzahl von Proteinspots und zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihren Signal-zu-Rausch-Verhältnissen.

Für weitere Untersuchungen wurden zwei dieser gebrauchsfertigen Färbelösungen, Sypro Ruby (BioRad) und Deep Purple (GE Helthcare), ausgewählt. Die Mark 12TM Proteinstandardslösung wurde mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und die Detektionsgrenze sowie die Präzision anhand der ermittelten Elektropherogramme untersucht und mit den Ergebnissen der CCB-gefärbten Gele, die mit dem Odyssey NIR-Detektor erzielt wurden, verglichen. Die Präzisionen sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst. Unter Verwendung des NIR-Detektors sind die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit der CCB-Färbung mit der Sypro Ruby-Färbung vergleichbar. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten [60, 61] zeigt die Deep Purple-Färbung jedoch eine geringere Empfindlichkeit als die Sypro-Färbung. Außerdem werden bei der Deep Purple Färbung für eine gute Reproduzierbarkeit deutlich höhere Proteinkonzentrationen benötigt.

Harris und Mitarbeiter [54] verglichen ebenfalls die Detektionen CCB-gefärbter Gele des NIR Detektors mit der traditionellen Densitometrie-Detektion und waren in der Lage, mehr als doppelt so viele Proteine mit dem NIR Imager zu detektieren. Smejkal [87] berichtet sogar davon, dass die CCB-Fluoreszenzmessung des NIR-Detektors doppelt so empfindlich wie die Sypro Ruby Färbung ist. Die hier vorliegende Arbeit bestätigt, dass Empfindlichkeit und Präzision der NIR Detektion CCB-gefärbter Gele vergleichbar mit der der Fluoreszenzfärbungen sind.

Tabelle 4-5: Vergleich der ermittelten Präzisionen und die zugehörigen Signal-zu-Rausch-Verhältnisse der verschiedenen Detektoren und Farbstoffen. Auf jedem Gel wurden sechs Bahnen mit der Mark 12TM-Standardlösung beladen und die Versuche jeweils dreimal wiederholt.

		CCB Odyssey, LiCor		CCB Typhoon, GE Healthcare		SYPRO Typhoon, GE Healthcare		Deep Purple Typhoon, GE Healthcare	
Proteingesamtkonzentration		0,309 µg/µl		0,707 µg/µl		0,309 µg/µl		0,619 µg/µl	
Protein	Mr[kDa]	RSD%	S/N	RSD%	S/N	RSD%	S/N	RSD%	S/N
Myosin	200,0	30,0	3,7	3,5	6,5	16,2	13,3	14,1	8,0
β-Galactosidase	116,3	6,2	10,3	5,8	12,3	6,0	19,0	7,0	22,1
Phosphorylase B	97,4	6,9	16,2	5,2	17,8	6,9	28,6	7,9	25,1
BSA	66,3	6,8	21,6	3,0	19,7	2,3	33,6	8,7	30,6
Glutamatdehydrogenase	55,4	9,2	20,3	5,0	20,8	7,0	38,4	7,1	41,7
Laktatdehydrogenase	36,5	4,8	43,9	1,7	31,8	2,9	66,1	3,6	39,3
Carboanhydrase	31,0	2,8	28,3	2,9	22,5	4,8	53,9	14,8	29,1
Trypsin Inhibitor	21,5	5,6	32,9	5,5	28,5	3,3	70,9	3,1	34,9
Lysozym	14,4	6,7	19,3	2,6	19,5	8,4	45,2	3,7	9,0
Aprotinin	6,0	3,8	33,1	5,7	22,6	3,2	64,8	5,3	43,1

4.3 Zusammenfassung

Die Detektion der Proteine aufgrund ihrer Nativen Fluoreszenz bietet viele Vorteile im Vergleich zu konventionellen Färbemethoden. Die Arbeiten von Zhang et al. zeigten, dass mit dieser Detektionsmethode gut definierte Peaks sowie ein sehr gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis realisierbar waren, wodurch eine deutliche Verbesserung der quantitativen Reproduzierbarkeit erreicht werden konnte. Als weiterer Vorteil dieser Detektionsmethode ist die wesentlich kürzere Analysenzeit zu nennen, da die sehr langen An- und Entfärbeschritte hier entfallen. Die technische Umsetzung dieser vielversprechenden Detektionsmethode bereitet allerdings noch einige Schwierigkeiten. Es scheinen Wechselwirkungen zwischen Protein und Gel aufzutreten, welche die Detektion aufgrund ihrer Nativen Fluoreszenz beeinträchtigen bzw. ganz verhindern.

Die Kombination aus CCB-gefärbten Gelen und dem Odyssey NIR Imaging System stellt aufgrund der geringen Detektionsgrenze und der guten Präzision als direkte Folge des sehr guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses die empfindlichste Detektionsmethode dar, die zur Zeit verfügbar ist. Somit kann die Hauptfehlerquelle der Gelelektrophorese, die für die unzureichende Präzision verantwortlich ist, mit dieser Detektionsmethode beseitigt werden.

5 Ausreißertests

5.1 Ausreißerproblematik

Häufig treten in Messreihen Werte auf, die von den restlichen Daten der Stichprobe stark abweichen. Solche extrem hohen oder extrem niedrigen Werte innerhalb einer Reihe unterschiedlicher Messwerte, von denen fraglich ist, ob sie unter den vorgegebenen Bedingungen möglich sind, bezeichnet man als Ausreißer [88]. Treten solche Extremwerte auf, muss zunächst immer eine Fehlersuche erfolgen. Lassen sich systematische Fehler, wie z.B. Rechen-, Schreib-, Mess-, Wäge- oder Verdünnungsfehler, ausschließen, stellt sich die Frage, ob dieser Extremwert überhaupt zur Grundgesamtheit der Stichprobe gehört, oder ob es sich hierbei wirklich um einen Ausreißer handelt. Ausreißertests dienen zur Identifizierung solcher Daten innerhalb einer Datenreihe, die als extrem unwahrscheinlich zu werten sind [89]. Oft scheint es sinnvoll, diese „fehlerhaften“ Messwerte nicht zu berücksichtigen. Solch ein leichtfertiger Umgang mit den Messwerten kann allerdings schnell zu manipulierten, nicht mehr aussagekräftigen Datensätzen führen. Dies ist besonders bei kleinen Datensätzen der Fall, in denen es ohnehin schwer zu beurteilen ist, ob ein stark vom Mittelwert abweichender Wert noch zur vorliegenden Grundgesamtheit gehört. Extreme Messwerte, die zunächst als Ausreißer betrachtet werden, können sich im Nachhinein als wichtiger Indikator für starke Abweichungen in Produktion oder Analytik erweisen. Eine Ausreißerelimination beinhaltet somit immer die große Gefahr einer beabsichtigten oder sogar häufiger einer unbeabsichtigten Manipulation. Auf der anderen Seite gibt es Datensätze, die ohne Ausreißerelimination falsch beurteilt würden.

Eine willkürliche Auswahl von Messergebnissen ist also nicht gestattet. Stattdessen stellen Ausreißertests ein wichtiges Diagnosewerkzeug dar, um verdächtige Werte auf Laborfehler zu untersuchen. Sie sind im Rahmen einer Fehlersuche zulässig, dürfen diese aber nicht ersetzen [90].

5.2 Ausreißertests

Es gibt eine Reihe von Rechenvorschriften zur Identifizierung von Ausreißern in Datensätzen, mit deren Hilfe eine Prüfgröße berechnet und anschließend mit einem tabellierten Zahlenwert unterschiedlicher statistischer Sicherheit verglichen wird. Einige dieser Ausreißertests werden im Folgenden kurz erläutert. Voraussetzung für all diese Tests ist, dass die Werte normalverteilt sind. Mit den Tests wird überprüft, ob ein Extremwert zu der Grundgesamtheit des vorliegenden Datensatzes gehört. Dieser Extremwert besitzt den maximalen Abstand zum Mittelwert und ist somit der kleinste oder größte Wert des Datensatzes. Für die Testung lautet die Nullhypothese folgendermaßen: „Der Extremwert x_n ist kein Ausreißer.“ Daraus ergibt sich dann folgende Alternativhypothese: „Der Extremwert x_n ist ein Ausreißer.“

Alle Ausreißertests werden schrittweise durchgeführt, d.h. es wird immer ein Extremwert überprüft. Stellt sich dabei heraus, dass dieser untersuchte Extremwert tatsächlich ein Ausreißer ist, so ist ohne diesen Wert ein neuer Mittelwert zu berechnen. Anschließend wird der nächste Extremwert überprüft, der gegenüber dem neuen Mittelwert die größte Abweichung zeigt. Die Prüfung ist erst dann beendet, wenn keine weiteren Ausreißer mehr nachgewiesen werden können.

5.2.1 Dixon

Zur Ausreißerprüfung nach Dixon wird aus den Messwerten eine Prüfgröße $r_{n;1-\alpha}$ [88, 91-94] berechnet. Als Prüfgröße wird die Beziehung des Abstandes zwischen dem größten und zweitgrößten bzw. dem kleinsten und zweitkleinsten Wert zur Gesamtspanne berechnet, je nachdem, welcher Wert als Extremwert (Ausreißer) angesehen wird. Für diesen Ausreißertest ist es daher zweckmäßig, zur Beurteilung der Extremwerte (kleinster / größter Wert) die Werte nach aufsteigender Größe zu ordnen. Ist der Extremwert der kleinste Wert, so wird Gleichung 34 verwendet, ist es der höchste Wert, so Gleichung 35. Diese Gleichungen gelten für Datensätze bestehend aus 3 bis 7 Messdaten. Bei größeren Datensätzen verändert sich der Nenner. In diesem Fall werden einige Messwerte (Extremwerte) bei der Berechnung der Gesamtspanne des Datensatzes nicht berücksichtigt, so dass nur ein relativ

zentraler Bereich in die Berechnung der Teststatistik einfließt [88, 92-94]. Die berechnete Prüfgröße wird anschließend mit einem tabellierten Grenzwert für eine gewisse Irrtumswahrscheinlichkeit α verglichen. Ist die berechnete Prüfgröße größer als der tabellierte Wert, so ist der Extremwert, der der Berechnung der Prüfgröße zugrunde liegt, ein Ausreißer.

$$r_{\min;1-\alpha} = \frac{x_{\min} - x_{\min+1}}{x_{\min} - x_{\max}} \quad (\text{Gleichung 34})$$

$$r_{\max;1-\alpha} = \frac{x_{\max} - x_{\max-1}}{x_{\min} - x_{\max}} \quad (\text{Gleichung 35})$$

$r_{1-\alpha}$: berechnete Prüfgröße für die gewählte statistische Sicherheit

x_{\min} : kleinster Wert (Extremwert)

$x_{\min+1}$: zweitkleinster Wert

x_{\max} : größter Wert (Extremwert)

$x_{\max-1}$: zweitgrößter Wert

5.2.2 Grubbs

Nach Grubbs wird eine Prüfgröße zum Test, ob der kleinste oder der größte Wert zu der Stichprobe gehört, nach Gleichung 36 berechnet. Dazu wird die Differenz zwischen dem kleinsten bzw. größten Wert und dem Mittelwert der Stichprobe gebildet und durch die Standardabweichung der Stichprobe geteilt [91, 92, 94]. Die berechnete Prüfgröße wird mit entsprechenden, tabellierten Zahlenwerten verglichen. Ist der Wert der Prüfgröße größer als der tabellierte Wert, so liegt ein Ausreißer vor.

$$T_{n;1-\alpha} = \frac{|x_n - \bar{x}|}{\hat{\sigma}} \quad (\text{Gleichung 36})$$

$T_{n;1-\alpha}$: berechnete Prüfgröße für die gewählte statistische Sicherheit

x_n : Extremwert (größter / kleinster Wert)

\bar{x} :	Mittelwert der Stichprobe
$\hat{\sigma}$:	Standardabweichung der Stichprobe

5.2.3 Nalimov

Die Berechnung der Prüfgröße für den Nalimov-Test erfolgt nach Gleichung 37. Hierzu wird zunächst, wie bei Grubbs, die Differenz zwischen Extremwert und Mittelwert gebildet und diese Differenz durch die Standardabweichung der Stichprobe geteilt. Anschließend wird dieser Quotient noch mit einem Wurzelterm multipliziert, in den die Anzahl der Messwerte einfließt [91, 95]. Ist die so berechnete Prüfgröße kleiner als der entsprechende tabellierte, kritische Wert, so liegt kein Ausreißer vor.

$$r_{n;1-\alpha} = \frac{|x_n - \bar{x}|}{\hat{\sigma}} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}} \quad (\text{Gleichung 37})$$

$r_{n;1-\alpha}$:	berechnete Prüfgröße für die gewählte statistische Sicherheit
x_n :	Extremwert (größter / kleinster Wert)
\bar{x} :	Mittelwert der Stichprobe
$\hat{\sigma}$:	Standardabweichung der Stichprobe
n :	Anzahl der Messwerte

5.2.4 Box-Plot

Der Box-Plot dient der übersichtlichen graphischen Darstellung einer Stichprobe (Beobachtung) entlang einer horizontalen Skala, die alle Beobachtungen umfasst, und bietet eine weitere Möglichkeit, Ausreißer zu identifizieren [92]. Die Daten werden zunächst der Größe nach geordnet, um den Median m sowie die „hinges“ (Angelpunkte) zu bestimmen, d.h. die Mediane der unteren h_u und oberen h_o Hälfte des Datensatzes, der durch den Median aufgeteilt ist. Die „hinges“ werden durch vertikale Striche abgetragen und die Enden der Striche so verbunden, dass ein Kasten (Box) entsteht. Dieser Kasten umfasst 50% aller Beobachtungswerte. Der Bereich zwischen den Angelpunkten, also die Differenz zwischen h_o und h_u , wird als

h-spread h bezeichnet und ist ein Maß für die Streuung der Daten im Zentrum des Datensatzes. Anschließend werden der innere und äußere Zaun (inner-fence und outer-fence) berechnet, Grenzwerte, die zur Beurteilung von Ausreißern herangezogen werden. Ist ein Wert 1,5-mal der Spannweite des h-spread von den Angelpunkten entfernt, liegt ein Ausreißer vor. Ist er 3-mal der Spannweite des h-spread entfernt, spricht man von einem krassen Ausreißer.

Anhand eines Beispiels soll die Erstellung eines Box-Plots verdeutlicht werden. Eine Gehaltsbestimmung wird zehnmal durchgeführt. Dabei werden folgende Werte ermittelt: 91,0 92,2 92,5 93,6 93,6 93,7 93,8 93,9 94,0 94,6. Mit Hilfe des Box-Plots soll nun überprüft werden, ob der Wert 91,0 zur Grundgesamtheit des Datensatzes gehört. In diesem Fall beträgt der Median 93,7 und der arithmetische Mittelwert 93,4. Die Angelpunkte, also die Mediane der oberen und unteren Hälfte, lauten $h_u = 92,5$ und $h_o = 93,9$, woraus sich der h-spread folgendermaßen berechnen lässt: $h = h_o - h_u = 93,9 - 92,5 = 0,7$. Mit dieser Differenz können nun die Grenzwerte (inner- und outer-fences) zur Identifizierung der Ausreißer berechnet werden:

inner-fences:

$$h_u - 1,5 \cdot h = 92,5 - 1,5 \cdot 0,7 = 91,45 \quad \text{und} \quad h_o + 1,5 \cdot h = 93,9 - 1,5 \cdot 0,7 = 94,95$$

outer-fences:

$$h_u - 3 \cdot h = 92,5 - 3 \cdot 0,7 = 90,4 \quad \text{und} \quad h_o + 3 \cdot h = 93,9 - 3 \cdot 0,7 = 96,0$$

Der Messwert von 91,0 liegt zwischen inner- und outer-fences und ist somit ein Ausreißer. Abbildung 5-1 zeigt die ermittelten Messwerte sowie die graphische Darstellung des Box-Plots. Diese graphische Darstellung veranschaulicht sehr schön die Verteilung des Datensatzes und erleichtert die Identifizierung möglicher Ausreißer.

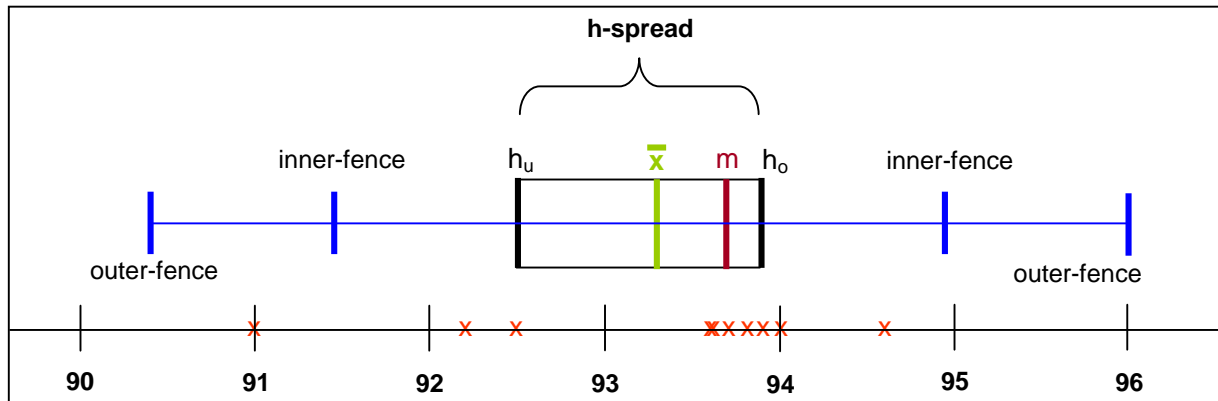


Abbildung 5-1: Box-Plot.

5.2.5 Shapiro-Wilk-Test

Der Test nach Shapiro und Wilk dient eigentlich zur Prüfung, ob eine Stichprobe normalverteilt ist. Er wird in der Literatur aber auch häufig zur Bestimmung von Ausreißern eingesetzt [94-96]. Die Prüfgröße wird nach Gleichung 38 berechnet und anschließend mit einem tabellierten Wert der W-Tabelle verglichen. Bei fast allen Tests wird gefragt, ob die berechnete Prüfgröße größer ist als der Tabellenwert. Beim Shapiro-Wilk-Test ist es jedoch umgekehrt. Hier muss die Prüfgröße kleiner oder gleich dem W-Tabellenwert sein, um einen Ausreißer zu erkennen.

$$W = \frac{\sum_{i=1}^{n/2} a_{n,n-i+1} \cdot (x_{n-i+1} - x_i)^2}{(n-1) \cdot \hat{\sigma}^2} \quad (\text{Gleichung 38})$$

- W : berechnete Prüfgröße
 $a_{n,n-i+1}$: tabellierte Shapiro-Wilks-Konstante
 $\hat{\sigma}$: Standardabweichung der Stichprobe
 x_i : Messwert der Stichprobe
 n : Anzahl der Messwerte

5.2.6 Median Absolute Deviation (MAD) nach Huber

Der Ausreißertest nach Huber [88] ist robuster als die anderen hier vorgestellten Tests, da in die Berechnung der Prüfgröße der Median und nicht der Mittelwert und die Standardabweichung einfließt. Nachdem der Median m der Stichprobe bestimmt wurde, wird der Betrag der Differenz jedes einzelnen Wertes und des Medianes gebildet (Gleichung 39). Aus diesen absoluten Werten wird wieder der Median r_{Median} bestimmt. Alle Werte werden als Ausreißer bezeichnet, für die gilt: Der Betrag der Differenz aus einem Extremwert und dem Median der Stichprobe ist größer oder gleich dem Produkt aus 4,5 und dem Median der absoluten Werte r_{Median} (Gleichung 40).

$$r_1 = |x_1 - m|, r_2 = |x_2 - m|, \dots, r_n = |x_n - m| \quad (\text{Gleichung 39})$$

$$|x_i - m| \geq 4,5 \cdot r_{\text{Median}} \quad (\text{Gleichung 40})$$

x_i :	Messwert der Stichprobe
m :	Median der Stichprobe
r_n :	absoluter Wert
r_{Median} :	Median der absoluten Werte
x_n :	Extremwert

5.3 Datensätze

Um objektiv beurteilen zu können, welchen Ausreißertest das beste Ergebnis liefert, also welche Tests die Ausreißer erkennt, muss vorausgesetzt werden, dass der bzw. die Ausreißer bekannt sind. Bei realen Datensätzen ist das in der Regel unmöglich zu beurteilen. Daher wurden hypothetische Datensätze, die auf normalverteilten Zufallszahlen basieren, mit Hilfe von MATLAB selbst generiert. Es wurden zwei Grundgesamtheiten erzeugt, die eine stellt die normalverteilte Grundgesamtheit der Messwerte dar, die andere die der Ausreißer. Für beide Normalverteilungen wurde eine Standardabweichung von $\sigma = 1$ festgelegt. Die Mittelwerte beider Verteilungen wurden unterschiedlich gewählt, so dass sich die beiden Normalverteilungen unterschiedlich stark überlappen. Der Mittelwert der Häufigkeitsverteilung der Messwerte betrug immer 100, für die Ausreißerverteilung wurden Werte von 97, 98,

104 bzw. 108 gewählt. Aus diesen Datensätzen wurden verschiedene Stichproben mit unterschiedlichem Stichprobenumfang n von 10 oder 20 Einzelmessungen zusammengestellt, die mit einer unterschiedlichen Anzahl von Ausreißern kontaminiert waren, mit keinem, einem, zwei oder drei Ausreißern. Mit Hilfe der in Kapitel 5.2 vorgestellten Ausreißertests wurden die so erzeugten Datensätze auf Ausreißer überprüft. Zusätzlich zu den Tests wurden die Messreihen von verschiedenen Analytikern intuitiv beurteilt. Dazu wurden die Datensätze wie in Abbildung 5-1 graphisch dargestellt. Diese Darstellungen enthielten zusätzliche Informationen über den Mittelwert \bar{x} sowie über die Standardabweichung $\hat{\sigma}$ der Stichprobe.

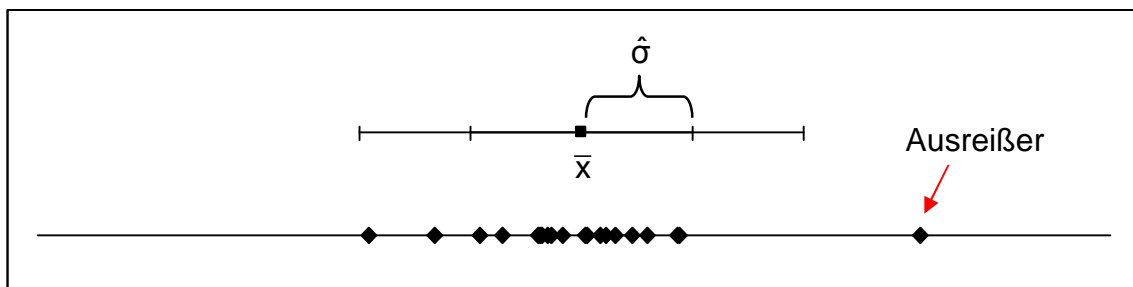


Abbildung 5-1: Graphische Darstellung eines Beispieldatensatzes bestehend aus 20 Messwerten mit einem Ausreißer. In der Darstellung sind zusätzlich der Mittelwert \bar{x} und die Standardabweichung $\hat{\sigma}$ der Stichprobe eingetragen.

5.4 Die Wahl der geeigneten Irrtumswahrscheinlichkeit

Die errechneten Prüfgrößen werden mit Tabellenwerten verglichen, die für unterschiedliche Irrtumswahrscheinlichkeiten angegeben werden. Die üblichen Irrtumswahrscheinlichkeiten sind 0,1%, 1%, 5% und 10%. Je nach Wahl der Irrtumswahrscheinlichkeit ist das Risiko, einen α -Fehler bzw. einen β -Fehler einzugehen, unterschiedlich hoch. Bei einem α -Fehler besteht die Gefahr, einen Wert als Ausreißer zu streichen, obwohl gar kein Ausreißer vorliegt. Liegt aber ein Ausreißer in dem Datensatz vor und wird nicht als solcher erkannt, dann spricht man von einem β -Fehler. Die Gefahr, einen α -Fehler zu riskieren, hängt direkt von der Wahl der Irrtumswahrscheinlichkeit ab. Wird diese z.B. mit $\alpha = 5\%$ festgelegt, so wird mit 5%iger Wahrscheinlichkeit ein Wert als Ausreißer identifiziert, obwohl dieser

keiner ist, d.h. aber auch, dass mit einer statistischen Sicherheit P von 95%, die Werte richtig beurteilt werden, da $P = 1 - \alpha$. Das Risiko eines β -Fehlers kann jedoch nicht frei gewählt werden. Trotzdem kann dieser durch die Wahl der Irrtumswahrscheinlichkeit α möglichst klein gehalten werden. Denn das Risiko eines β -Fehlers wird umso größer, je kleiner die Irrtumswahrscheinlichkeit α gewählt wird [88, 91].

Für die Bewertung der Datensätze war es entscheidend, den β -Fehler möglichst gering zu halten, d.h. zu gewährleisten, dass die Ausreißer mit ausreichend hoher statistischer Sicherheit identifiziert werden. Daher wurden die Ausreißertests, wie von Kaiser und Gottschalk vorgeschlagen [96], mit zwei verschiedenen Irrtumswahrscheinlichkeiten α durchgeführt, mit $\alpha = 5\%$ ($P = 95\%$) und $\alpha = 1\%$ ($P = 99\%$), um so das Risiko zu verringern, einen Ausreißer nicht zu erkennen.

Ist die mit Hilfe des Ausreißertests berechnete Prüfgröße kleiner als der jeweilige tabellierte Wert für eine statistische Sicherheit von 95%, so liegt kein Ausreißer vor. In diesem Fall liegt ein geringeres Risiko vor, einen β -Fehler zu begehen. Ist die berechnete Prüfgröße größer bzw. gleich groß wie die tabellierte Vergleichsgröße von $P = 99\%$, liegt eindeutig ein Ausreißer vor. In diesem Fall liegt ein geringeres Risiko eines α -Fehlers vor.

Liegt der Wert der berechneten Prüfgröße allerdings im Bereich zwischen den tabellierten Werten für die statistischen Sicherheiten von 95% und 99%, dann wird der entsprechende Extremwert noch nicht als eindeutiger Ausreißer, sondern als „wahrscheinlicher Ausreißer“ bezeichnet. In diesem Fall ist mit dem gegebenen Stichprobenumfang keine eindeutige Entscheidung möglich. Die Anzahl der Stichproben muss daher erhöht werden, und die Prüfung mit der höheren Stichprobenzahl wiederholt werden. In Tabelle 5-1 sind die Entscheidungskriterien nach Gottschalk und Kaiser noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 5-1: Bewertung der Ausreißertests mit zwei verschiedenen Irrtumswahrscheinlichkeiten nach Gottschalk und Kaiser [96].

α $P = 1 - \alpha$	1 % 99 %	5 % 95 %	Ergebnis
Prüfgröße < Schwellenwert	+	+	kein Ausreißer
Prüfgröße < Schwellenwert	+	-	„wahrscheinlicher Ausreißer“ • Datenzahl erhöhen
Prüfgröße < Schwellenwert	-	-	Ausreißer

5.5 ROC-Kurven

Die Abkürzung ROC-Kurve steht für Receiver-Operating-Characteristic-Kurve. Den Ursprung haben diese Kurven in Studien, die das Potenzial menschlicher Beobachter untersuchte, zwischen einem wahren Signal und Rauschen von Radaranlagen zu unterscheiden. Seit den 80er Jahren wird diese Methodik zunehmend dafür genutzt, diagnostische Tests zu beurteilen, die zwischen zwei Krankheitszuständen unterscheiden. Ziel einer ROC-Kurven-Analyse ist es, ein Ja-Nein-Entscheidungsverfahren zu beurteilen [97].

5.5.1 Ermittlung von ROC-Kurven

Der ursprüngliche Versuchsaufbau zur Ermittlung der ROC-Kurven bestand aus einer Radaranlage, die ein Rauschen verursacht, einem Sender, der ein Signal erzeugen kann, sowie einem Empfänger, also einer Versuchsperson, deren Wahrnehmungsverhalten beurteilt werden sollte. Zum Empfänger wird dann zufällig nur Rauschen oder Rauschen mit Signal gesendet. Die Versuchsperson hat dann die Ja-Nein-Entscheidung zu treffen, ob ein Signal vorhanden ist oder nicht. Diesen allgemeinen Versuchsaufbau zur Ermittlung von ROC-Kurven verdeutlicht Abbildung 5-2.

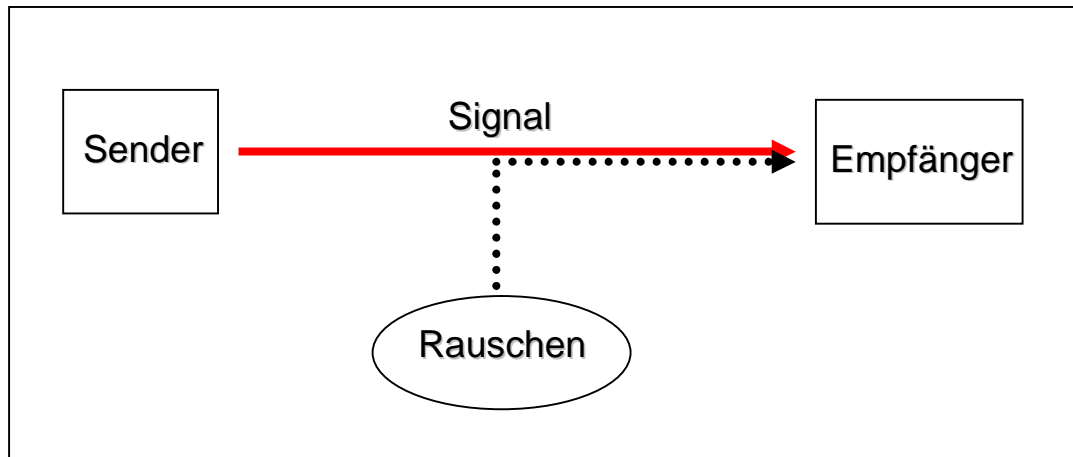


Abbildung 5-2: Ursprünglicher Versuchsaufbau zur Ermittlung von ROC-Kurven.

Zur Konstruktion der ROC-Kurve werden zwei Kenngrößen benötigt: die Sensitivität und die Spezifität, die aus den Werten der Vierfeldertafel ermittelt werden. In der Vierfeldertafel (Tabelle 5-2) sind die Ergebnisse, d.h. Wahrnehmungsverhalten des Empfängers, zusammengefasst. Wenn der Test positiv ausfällt, d.h. der Empfänger erkennt ein Signal, dann gibt es zwei Möglichkeiten, seine Entscheidung zu beurteilen. Entweder wurde wirklich ein Signal gesendet, dann ist das Testergebnis richtig positiv (rp) oder der Empfänger entscheidet sich für ein Signal, obwohl gar keins gesendet wurde. Dann ist das Testergebnis falsch positiv (fp). Bei einer negativen Bewertung des Testergebnisses gibt es auch zwei Bewertungsmöglichkeiten: richtig negativ (rn), d.h. es wurde kein Signal erzeugt und auch nicht vom Empfänger wahrgenommen oder falsch negativ (fn), wenn der Empfänger das gesendete Signal nicht erkennt. Insgesamt gibt es also vier verschiedene Möglichkeiten, die Entscheidung des Empfängers zu beurteilen.

Tabelle 5-2: Vierfeldertafel, die die Ja-Nein-Entscheidung bzw. das Wahrnehmungsverhalten des Empfängers zusammenfasst (rp = richtig positiv, fp = falsch positiv, fn = falsch negativ, rn = richtig negativ).

	Signal	kein Signal
Testergebnis positiv	rp	fp
Testergebnis negativ	fn	rn
Summe	rp + fn	rn + fp

Aus dieser Vierfeldertafel lassen sich nun die Sensitivität und die Spezifität berechnen. Die Sensitivität (Gleichung 41) ist der Anteil der richtig erkannten Signale (rp) an allen gesendeten Signalen, ob erkannt oder nicht (rp + fn). Die Sensitivität ist somit ein Maß für die Trefferhäufigkeit. Die Spezifität (Gleichung 42) wird als Anteil der richtig nicht als Signal beurteilten Testsergebnisse (rn) an allen Tests, in denen kein Signal gesendet wurde (rn + fp), berechnet und zeigt somit die Häufigkeit falscher Alarme an.

$$\text{Sensitivität} = \frac{rp}{rp + fn} \quad (\text{Gleichung 41})$$

$$\text{Spezifität} = \frac{rn}{rn + fp} \quad (\text{Gleichung 42})$$

Eine ROC-Kurve, wie sie in Abbildung 5-3 dargestellt ist, erhält man, indem die Sensitivität über der Spezifität aufgetragen wurde. Die Fläche unter der Kurve (AUC, Abk. für area under the curve) ist ein Maß für die Leistungsfähigkeit des Empfängers. Im Idealfall haben Sensitivität und Spezifität den Wert eins. Die Kurve verläuft dann in die linke, obere Ecke, und die AUC nimmt den Wert eins an. Verläuft die ROC-Kurve in die rechte, obere Ecke, also wie eine Winkelhalbierende, wäre es so, als würde der Empfänger zufällig reagieren [97].

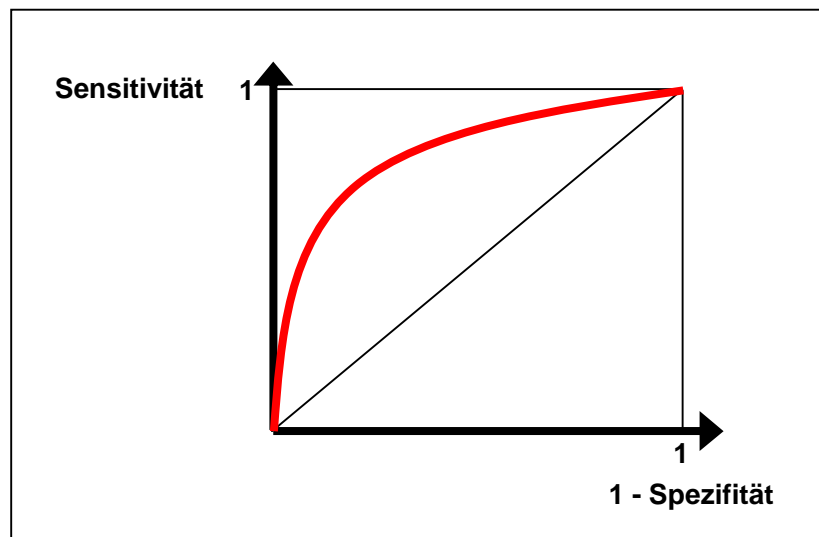


Abbildung 5-3: Verlauf einer ROC-Kurve.

5.5.2 Analyse der Ausreißertests mit Hilfe der ROC-Kurven

Das Prinzip der Beurteilung des Wahrnehmungsverhaltens kann auch auf die Datensätze übertragen werden. Mit Hilfe der ROC-Kurven soll in diesem Fall die Leistungsfähigkeit des Ausreißertests bzw. des Analytikers beurteilt werden. Die Datensätze entsprechen dem Rauschen der Radaranlagen, ein Ausreißer steht für das gesendete Signal und der Analytiker bzw. die Ausreißertests, die die Datensätze beurteilen sollen, entsprechen dem Empfänger.

Die Entscheidungsmöglichkeiten, die der Empfänger (Analytiker, Ausreißertest) treffen kann, sollen anhand der Häufigkeitsverteilungen veranschaulicht werden. Die Grundgesamtheit der Messwerte als auch die der Ausreißer liegen jeweils als Normalverteilung vor. Diese beiden Gauß'schen Glockenkurven überlappen sich zum Teil wie in Abbildung 5-4 dargestellt. Wird ein Wert aus der Grundgesamtheit der Ausreißer (rote Glockenkurve) auch als Ausreißer identifiziert, so liegt ein richtig positives (rp) Testergebnis vor. Falls der Wert zwar aus der Grundgesamtheit der Ausreißer stammt, aber eher in dem Bereich zu finden ist, in dem sich die beiden Normalverteilungen überlappen, so kann dieser nicht mehr eindeutig als Ausreißer erkannt werden. Es liegt dann ein falsch negatives (fn) Testergebnis vor. Ab einem gewissen kritischen Wert x_c ist die Intensität der Ausreißer nicht mehr ausreichend,

um als solche erkannt zu werden. Die Grundgesamtheit der Ausreißer und die der Messdaten vermischen sich in diesem Bereich. So werden auch Werte aus der Grundgesamtheit der Messdaten ab dem kritischen Wert x_c der falschen Grundgesamtheit zugeordnet, als Ausreißer definiert und führen so zu einem falsch positiven Testergebnis (fp). Ein Messwert kann nur eindeutig der Messdaten-Normalverteilung zugeordnet werden und zu einem richtig negativen (rn) Ergebnis führen, wenn er nicht in dem Bereich liegt, in dem sich beide Verteilungen überlappen. Alle Entscheidungsmöglichkeiten sind zum einen den Flächen unter den Normalverteilungskurven in Abbildung 5-4 zugeordnet und zum anderen in der Vierfeldertafel in Tabelle 5-3 zusammengefasst.

Tabelle 5-3: Vierfeldertafel mit allen Ja-Nein-Entscheidungsmöglichkeiten bei der Bewertung von Ausreißern in Datensätzen.

	Ausreißer	kein Ausreißer
Testergebnis positiv	rp	fp
Testergebnis negativ	fn	rn
Summe	rp + fn	rn + fp

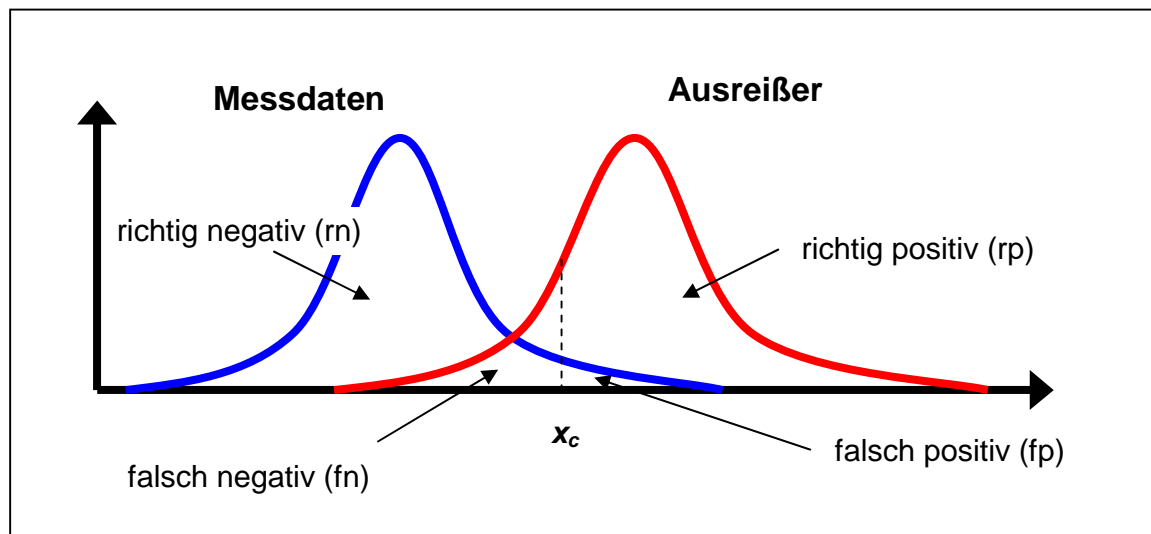


Abbildung 5-4: Verteilung der Messwerte und der Ausreißer, die sich in einem Teil überlappen. Den Bereichen unter der Kurve sind die möglichen Ja-Nein-Entscheidungen zugeordnet. x_c ist der kritische Wert, ab dem die Intensität des Ausreißers (Signals) nicht mehr erkannt wird.

5.6 Bewertung der Ausreißertests

Die Analytiker, die intuitiv die Datensätze beurteilen sollten, erkannten die Ausreißer sehr gut. Probleme traten bei einer höheren Kontamination auf, d.h. wenn mehr als nur ein Ausreißer in dem Datensatz enthalten waren. In diesem Fall wurden diese nicht bzw. nicht alle erkannt. Bei einer höheren Stichprobenzahl ($n = 20$) fällt es den Analytikern jedoch schwerer, die Datensätze richtig zu beurteilen.

Der Box-Plot ist eine schnelle und sehr anschauliche Methode, sich ein Bild über den Datensatz zu machen und mögliche Ausreißer zu identifizieren. Allerdings benötigt diese Methode eine höhere Stichprobenzahl. Bei einer stärkeren Kontamination, d.h. wenn drei Ausreißer vorliegen, werden nur zwei oder sogar nur einer erkannt.

Alle Ausreißertests wurden, wie von Kaiser und Gottschalk vorgeschlagen [96], mit zwei verschiedenen Irrtumswahrscheinlichkeiten α ($\alpha = 5\%$, $\alpha = 1\%$) durchgeführt, um so das Risiko zu verringern, einen Ausreißer nicht zu erkennen. Bei einem Stichprobenumfang von $n = 10$ gibt allerdings nur der Test nach Nalimov einen Hinweis darauf, dass Ausreißer vorliegen könnten („wahrscheinlicher Ausreißer“). Dieser Test benötigt also eine höhere Anzahl von Einzelmessungen, um die

Ausreißer in den Datensätzen zu erkennen. Dies bestätigt die Analyse der Datensätze, die aus 20 Messwerten bestehen. Sind diese mit einem oder zwei Ausreißern kontaminiert, so identifiziert der Nalimov-Test diese. Liegen jedoch drei Ausreißer vor, reicht der Stichprobenumfang nicht aus, um diese eindeutig zu identifizieren. Hier gibt es aber wieder einen Hinweis auf mögliche Ausreißer, die vermutlich bei einer höheren Anzahl von Messwerten wieder als solche erkannt werden würden. Die Ausreißertests nach Grubbs, Dixon, Huber und der Test auf Normalverteilung nach Shapiro und Wilk erkennen keine Ausreißer. Der MAD-Test nach Huber identifiziert sogar in den höheren Datensätzen einige Werte als Ausreißer, obwohl hier keine vorliegen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-4 zusammengefasst.

Die unterschiedlichen Ausreißertests sollten anhand der ROC-Kurven miteinander verglichen werden. Da jedoch die meisten Ausreißertests die Ausreißer überhaupt nicht erkennen, sind in Abbildung 5-5 nur zwei Ausreißertests, der Test nach Nalimov und der Test nach Dixon sowie die Bewertung durch die Analytiker in einer ROC-Kurve exemplarisch zusammengefasst. Da nur wenig Daten zur Erstellung der Kurven vorlagen, ist der Verlauf der ROC-Kurven aus diesen annäherungsweise abgeschätzt. Dargestellt sind die entsprechenden Kurven für die Datensätze bestehend aus 20 Einzelmessungen, die mit keinem, einem, zwei bzw. drei Ausreißern kontaminiert waren. Die ROC-Kurve, die die Bewertung der Analytiker darstellt, verläuft sehr weit in die linke, obere Ecke und nähert sich dem Idealfall an.

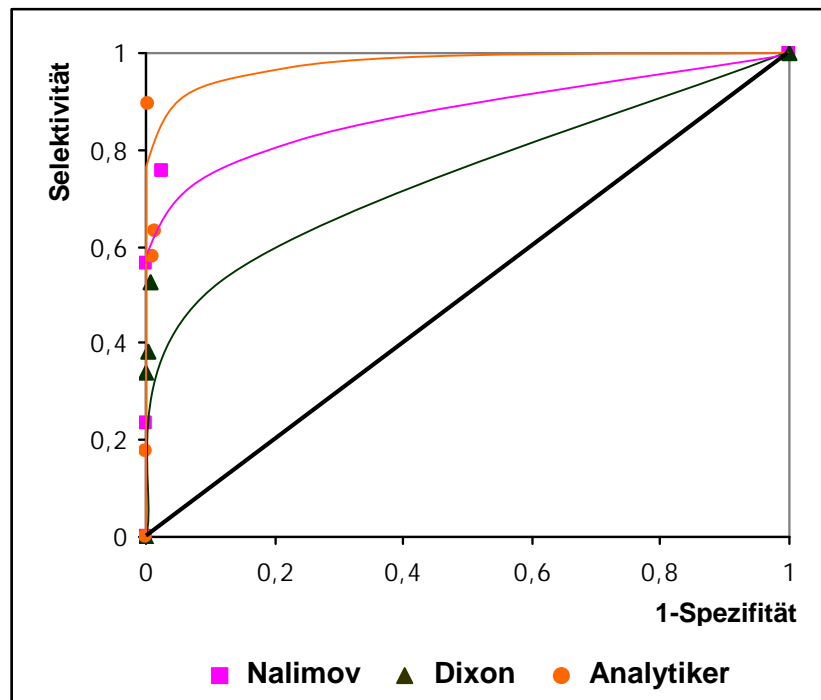


Abbildung 5-5: ROC-Kurven der Ausreißertests nach Nalimov und Dixon sowie der intuitiven Bewertung der Analytiker. Der Kurvenverlauf ist aus den wenigen Messdaten für Selektivität und Spezifität abgeschätzt. Untersucht wurden in diesem Fall Datensätzen bestehend aus 20 Einzelmessungen, in denen kein, ein, zwei oder drei Ausreißer enthalten waren.

Tabelle 5-4: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Ausreißertests.

	Stichprobenumfang n = 10			Stichprobenumfang n = 20			
Ausreißer-Test	kein Ausreißer	ein Ausreißer	zwei Ausreißer	kein Ausreißer	ein Ausreißer	zwei Ausreißer	drei Ausreißer
Dixon	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Grubbs	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Nalimov	negativ	„wahrscheinlicher Ausreißer“	„wahrscheinlicher Ausreißer“	negativ	positiv	positiv	„wahrscheinlicher Ausreißer“
MAD nach Hber	negativ	negativ	negativ	teilweise positiv	negativ	negativ	negativ
Shapiro-Wilk	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Box-Plot	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	teilweise positiv

5.7 Bootstrap-Verfahren

Mit den meisten Ausreißertests konnten die Extremwerte in den Datensätzen nicht als Ausreißer identifiziert werden. Es zeigte sich auch, dass ein größerer Stichprobenumfang ($n = 20$) notwendig war, um die Ausreißer eindeutig als solche zu erkennen. Aus Zeit- und Kostengründen lässt sich der Stichprobenumfang in der Praxis allerdings nicht unbegrenzt ausweiten.

Neben den relativ einfachen Ausreißertests, wie sie unter 5.2 vorgestellt wurden, gibt es auch komplexere Algorithmen zur Ausreißerdetektion. Zu diesen Techniken gehören z.B. das Minimum Volume Ellipsoid (MVE), das Multivariate Trimming (MVT) sowie die Minimum Covariance Determinant (MCD) [98-100]. Diese sehr robusten Verfahren der multivariaten Datenanalyse [99] erkennen auch eine höhere Kontamination an Ausreißern sehr gut. Allerdings sind dafür lange Bearbeitungszeiten und komplizierte Programmierungen notwendig. Egan und Morgan [98] stellen zwei weitere Methoden zur multivariaten Ausreißerdetektion vor, die einfach umzusetzen und auszuwerten sind: (i) Resampling by Half-Means (RHM) und (ii) Smallest Half-Volume (SHV). Das Prinzip der RHM-Methode beruht darauf, dass durch wiederholtes Probenziehen aus einem Teil der Stichprobe ohne Zurücklegen eine neue Verteilung erzeugt wird. Das Histogramm dieser neuen Verteilung dient anschließend zur Beurteilung der Daten und zur Identifizierung von Ausreißern. Bei der SHV-Methode wird aus den Abständen zwischen allen Datenpunkten eine Matrix erstellt, und anschließend werden die Ausreißer über die Mahalanobis-Distanz identifiziert.

In Anlehnung an die Arbeit von Egan und Morgan sollte ein vereinfachtes, robustes Verfahren zur Ausreißerdetektion entwickelt werden. Dazu wurden mit Hilfe des Bootstrap-Verfahrens aus der vorliegenden Stichprobe viele neue Stichproben gezogen und daraus die zugrundeliegende Verteilung rekonstruiert. Die resultierende Verteilungsfunktion sollte anschließend zur Beurteilung des Datensatzes und zur Ausreißerbestimmung herangezogen werden.

5.7.1 Das Prinzip des Bootstrap-Verfahrens

Mit dem Bootstrap-Verfahren [101-104] kann direkt aus der vorliegenden Stichprobe die Verteilung abgeschätzt werden, die der Stichprobe zugrunde liegt, indem viele „Bootstrap“-Stichproben aus der untersuchten Stichprobe mit „Zurücklegen“ gezogen werden. Aus der so rekonstruierten Grundgesamtheit können dann statistisch interessante Parameter θ , wie z.B. Mittelwert, Standardabweichung, Konfidenzintervalle, abgeschätzt werden.

Der Bootstrap geht davon aus, dass die konkret vorliegende Stichprobe als beste Approximation der Grundgesamtheit angesehen werden kann. Aus der Stichprobe werden mehrere neue Stichproben gezogen. Dabei werden die folgenden Schritte vorgenommen:

1. Aus der konkret vorliegenden Stichprobe werden B-mal neue Stichproben des Umfangs n mit „Zurücklegen“ gezogen. Diese neuen Stichproben werden als Bootstrap-Stichprobe bezeichnet.
2. Für jede einzelne Bootstrap-Stichprobe wird der interessierende Parameter $\hat{\theta}_b^*$ berechnet. Aus diesen Bootstrap-Parametern wird die Verteilung $\hat{\theta}^*$ konstruiert. Alle Parameter, die aus dem Bootstrap-Verfahren abgeschätzt werden, werden mit einem Stern gekennzeichnet.
3. Von der Verteilung $\hat{\theta}^*$ können Rückschlüsse über die Ursprungsverteilung und somit über den interessierenden Parameter der Stichprobe gezogen werden.

Anhand eines Beispiels soll das Prinzip des Bootstraps noch einmal erläutert werden. Eine Gehaltsbestimmung wird achtmal durchgeführt. In Tabelle 5-5 sind die ermittelten Gehälter der Stichprobe in mg dargestellt. Aus dieser Stichprobe ($n = 8$) wird der Mittelwert berechnet, um so auf den wahren Gehalt Rückschlüsse zu ziehen. In diesem Fall ist der interessierende Parameter θ also der Mittelwert. Aber wie genau ist der so ermittelte Gehalt (der Mittelwert)? Um das abzuschätzen, werden aus der vorliegenden Stichprobe mehrere Bootstrap-Stichproben mit jeweils einem Stichprobenumfang von $n = 8$ mit „Zurücklegen“ gezogen (s. Tabelle 5-5). Daher können in der Bootstrap-Stichprobe dieselben Werte häufiger vorkommen, obwohl sie in der Ursprungsstichprobe nur einmal auftauchen. Der

Stichprobenumfang der Bootstrap-Stichprobe entspricht dem Umfang der konkret vorliegenden Stichprobe. Nachdem dieser Vorgang einhundertmal wiederholt wurde, kann aus jeder dieser einhundert Bootstrap-Stichproben der Mittelwert $\hat{\theta}_b^*$, mit $b = 1, 2, \dots, 100$, berechnet werden. Von diesen Mittelwerten $\hat{\theta}_b^*$ kann eine Verteilung $\hat{\theta}^*$ konstruiert werden, aus der der interessierende Parameter, hier der Mittelwert, berechnet wird. Zur Beurteilung der Genauigkeit des Mittelwertes $\hat{\theta}$ der Stichprobe in Bezug auf θ kann aus der Bootstrap-Verteilung $\hat{\theta}^*$ der Mittelwert berechnet und direkt mit dem geschätzten Mittelwert $\hat{\theta}$ der Stichprobe (Punktschätzung) [101] oder über die Berechnung eines Konfidenzintervalls aus der Verteilung $\hat{\theta}^*$ [101, 105, 106] (Intervallschätzung) verglichen werden.

Tabelle 5-5: Ziehen der Bootstrap-Stichprobe aus einer konkret vorliegenden Stichprobe am Beispiel einer Gehaltsbestimmung. Angegeben sind die ermittelten Gehälter in mg sowie die aus der Stichprobe berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen.

Stichprobe		Mittelwert	Standard- abweichung
vorliegende Stichprobe	103, 98, 99, 99, 102, 99, 98, 101	$\hat{\theta} = 99,9$	$\hat{\sigma} = 1,9$
Bootstrap- Stichprobe $b = 1$	98, 99, 99, 99, 102, 103, 98, 103	$\hat{\theta}_1^* = 100,1$	$\hat{\sigma}_1^* = 2,2$
Bootstrap- Stichprobe $b = 2$	103, 99, 102, 103, 98, 103, 101, 103	$\hat{\theta}_2^* = 101,5$	$\hat{\sigma}_2^* = 2,0$
Bootstrap- Stichprobe $b = 3$	103, 98, 99, 103, 99, 99, 99, 98	$\hat{\theta}_3^* = 99,8$	$\hat{\sigma}_3^* = 2,1$
...
Bootstrap- Stichprobe $b = 100$	98, 98, 102, 103, 101, 101, 99, 102	$\hat{\theta}_{100}^* = 100,5$	$\hat{\sigma}_{100}^* = 1,9$

5.7.2 Bewertung der Datensätze mit Hilfe des Bootstraps

Aus den selbst generierten Datensätzen mit einem Stichprobenumfang von $n = 20$ wurde jeweils 1999-mal mit Hilfe der Software MATLAB eine Bootstrap-Stichprobe gezogen, um so die Verteilung zu erhalten, die der Bootstrap-Stichprobe zugrunde liegt. Aus jeder einzelnen Bootstrap-Stichprobe wurden Mittelwert \bar{x}_b^* und Standardabweichung $\hat{\sigma}_b^*$ berechnet. Aus den Mittelwerten \bar{x}_b^* wurde anschließend das Histogramm der Verteilung erstellt, das zur Bewertung des Datensatzes und zur Identifizierung der Ausreißer dienen sollte. In Tabelle 5-6 ist exemplarisch ein Datensatz, der einen Ausreißer (Stichprobenanzahl: 20; Ausreißer: 113,130) enthält, dargestellt. Das nach dem Bootstrap resultierende Histogramm dieses Beispieldatensatzes zeigt Abbildung 5-6.

Tabelle 5-6: Beispieldatensatz bestehend aus 20 Stichproben; die einzelnen Stichproben sind der Größe nach geordnet; der Wert mit der Stichprobennummer 20 stellt den Ausreißer dar.

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	97,320	98,183	98,772	99,062	99,526	99,569	99,574	99,649	99,717	99,851
n	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	100,145	100,166	100,345	100,423	100,536	100,760	100,967	101,344	101,381	113,130

Mittelwert: 100,521
 Standardabweichung: 3,133
 Median: 99,998

Das Histogramm in Abbildung 5-6 zeigt für diesen Beispieldatensatz deutlich eine linksschiefe Verteilung. Durch den Ausreißerwert von 113,130 flacht die Häufigkeitsverteilung zur rechten Seite, also in Richtung des Ausreißers, stärker ab. Die Abweichung von der Form der Gauß'schen Glockenkurve sowie der langgezogene Verlauf der Verteilung zu den höheren Werten ist ein Hinweis darauf, dass der größte Wert ein Extremwert, also Ausreißer, sein könnte. Dies ist aber noch kein eindeutiger Beweis, sondern bestätigt nur die Vermutung aus der vorliegenden Stichprobe. Auch durch die Variation der Anzahl an Bootstrap-Stichproben ($B = 999$ und $B = 2999$) konnte kein deutlicheres Histogramm konstruiert werden.

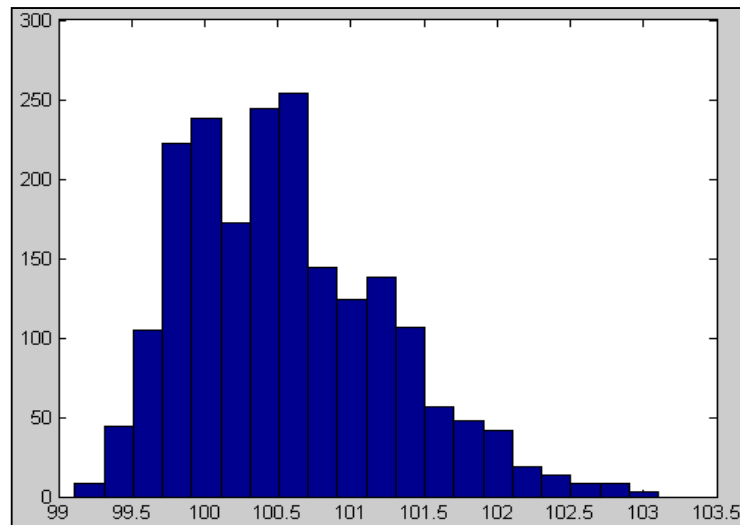


Abbildung 5-6: Histogramm einer Bootstrap-Stichprobe ($B = 1999$); der Datensatz, der dieser Bootstrap-Stichprobe zugrunde liegt (vergl. Tabelle 5-6), besteht aus einem Stichprobenumfang von $n = 20$, in dem ein Ausreißer enthalten ist.

In einem weiteren Schritt wurden die einzelnen Bootstrap-Stichproben zunächst skaliert. Dazu wurde der Quotient aus dem Mittelwert \bar{x}_b^* und der Standardabweichung $\hat{\sigma}_b^*$ jeder einzelnen Bootstrap-Stichprobe gebildet. Aus dieser neuen Größe ($\bar{x}_b^* / \hat{\sigma}_b^*$) wurde anschließend wieder ein Histogramm erstellt. Ein solches Histogramm der skalierten Bootstrap-Stichproben zeigt Abbildung 5-7.

Ist der Datensatz, wie im vorliegenden Beispiel, mit einem Ausreißer kontaminiert, so erhält man durch die Skalierung zwei Häufungen, eine für die Grundgesamtheit des Datensatzes und eine für die der Ausreißer. Allerdings beobachtet man dies nur, wenn ein extremer Ausreißer in dem Datensatz vorliegt. Liegt der Extremwert nahe an der Grundgesamtheit der Stichprobe, so überdecken sich die beiden Histogramme wieder und eine eindeutige Bewertung ist nicht mehr möglich.

Mit Hilfe des Bootstrap-Verfahrens ist eine eindeutige Bewertung der Datensätze und somit Identifizierung der Ausreißer bisher noch nicht möglich. Mittlerweile liegen jedoch weitere, vielversprechende Untersuchungen zur Ausreißerdetektion vor [107,

108], die auf den sogenannten R-NN Curves [109] beruhen, einer distanzbasierten Methode aus dem Bereich der Cheminformatik.

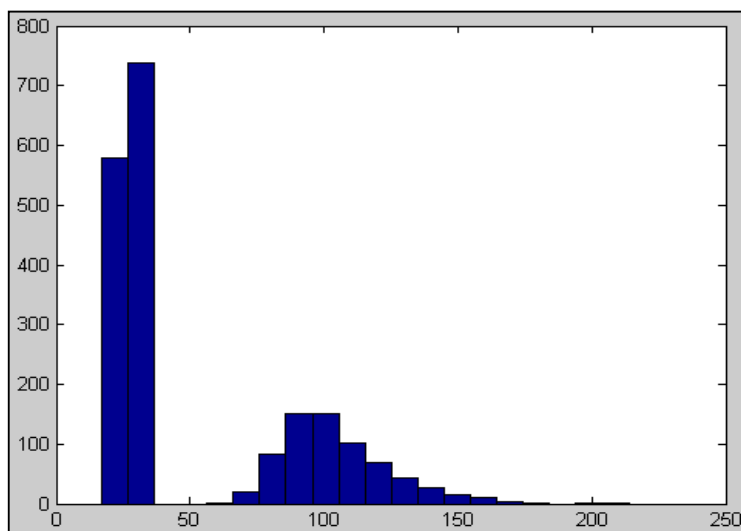


Abbildung 5-7: Histogramm der skalierten Bootstrap-Stichprobe des gleichen Datensatzes, der in Tabelle 5-6 und Abbildung 5-6 dargestellt ist (mit $n = 20$ und einem Ausreißer).

6 Versuchsdesign

Nachdem die Hauptfehlerquellen identifiziert und beseitigt wurden, überdecken sie nun nicht länger die kleineren Varianzkomponenten, die einen geringeren Einfluss auf die Gesamtpräzision ausüben. Für die anschließende Untersuchung solcher nachrangiger Varianzkomponenten stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

Bei der klassischen Methodenoptimierung wird zunächst ein Faktor (z.B. die Temperatur, Färbezeit, Probenaufarbeitung etc.) verändert, während die anderen konstant gehalten werden. Wurden so die optimalen Bedingungen für die untersuchte Größe gefunden, kann anschließend der nächste Faktor untersucht werden. Diese klassische Methode wird als „one-factor-at-a-time“-Methode (OFAT) bezeichnet. Mit ihr können zwar Veränderungen des Ergebnisses leicht den untersuchten Faktoren zugeordnet werden, die Umsetzung einer solchen Untersuchung ist allerdings viel zu arbeits- und zeitaufwendig, besonders zur Untersuchung einer großen Anzahl von Variablen ist die OFAT-Methode in der Praxis nicht umsetzbar. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass trotz des großen experimentellen Aufwandes keine Aussagen darüber getroffen werden können, ob die untersuchten Faktoren sich möglicherweise gegenseitig beeinflussen, d.h. dass der Effekt des einen Faktors davon abhängt, welchen Wert der andere Faktor hat.

Eine weitere Möglichkeit zur Methodenoptimierung stellt die Durchführung eines vollständig faktoriellen Versuchsdesigns dar, welches alle möglichen Kombinationen der voneinander unabhängigen Faktoren untersucht. Für eine kleine Anzahl von Faktoren ist solch ein Versuchsdesign sehr hilfreich, für eine große Anzahl jedoch wieder ungeeignet, denn, wie Gleichung 43 zeigt, nimmt die Anzahl der Faktorstufenkombinationen m und somit die Anzahl der Versuche mit der Anzahl der zu untersuchenden Faktoren k sehr schnell zu.

$$m = 2^k \quad \text{(Gleichung 43)}$$

m: Faktorstufenkombination (Anzahl der Versuche)

k: Einflussfaktor

Zur Untersuchung von z.B. sieben Faktoren auf je zwei Stufen sind somit 128 (2^7) Versuche notwendig. Der Versuchsaufwand wird viel zu groß, die Gefahr einer Vertauschung von Versuchseinheiten nimmt zu, und es ist praktisch unmöglich, alle Einzelversuche unter identischen Bedingungen durchzuführen. Eine weitere Alternative, mit der der Versuchsaufwand extrem reduziert werden kann, bietet z.B. das Plackett-Burman-Versuchsdesign [110].

6.1 Plackett-Burman-Versuchsdesign

Das von Plackett und Burmann [110-114] entwickelte Versuchsdesign gehört zu den sogenannten Screening-Versuchsdesigns. Mit Hilfe eines Screening-Designs sollen mögliche Einflussfaktoren bezüglich ihrer Bedeutung auf eine Zielgröße hin untersucht werden. Diese sind besonders gut geeignet, wenn erst wenig über eine Problemstellung bekannt ist. Mit einem stark reduzierten Versuchsplan, d.h. mit möglichst wenig Versuchen können relativ viele Faktoren untersucht werden, ob und wie sie die Zielgröße beeinflussen. Auf diese Weise können jedoch nur starke Effekte erkannt werden. Dies ist zunächst eine relativ grobmaschige Zielsetzung, die allerdings einen sehr guten Überblick verschafft. Nach dem Screening, also nach dem „Ausgieben“ der Faktoren, die einen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße ausüben, müssen diese in weiteren Versuchen genauer untersucht werden.

In vielen Fällen wurden Plackett-Burman-Versuchsdesigns erfolgreich zur Bestimmung der Einflussfaktoren in Robustheitsuntersuchungen [112, 115, 116] oder zur Methodenoptimierung eingesetzt. Besonders im Bereich der Mikrobiologie nutzten viele Arbeitsgruppen das Plackett-Burman-Design, um die Wachstumsbedingungen für Bakterienkulturen zu optimieren [117-121]. Weiterhin konnten mit Hilfe dieser Versuchsdesigns viele Trenntechniken verbessert werden. In der Kapillarelektrophorese (CE) zum Beispiel konnten solche Screening-Designs erfolgreich zur Verbesserung der Peakform und Auflösung sowie zur Verkürzung der Analysenzeiten [122-124] eingesetzt werden. Viele andere Analysentechniken konnten mit Hilfe des Plackett-Burman-Designs verbessert werden wie RT-PCR (reversed transcription-polymerase chain reaction) [125], ELISA (enzyme linked immunosorbant assay) [126] oder die HG-GPMAS (hydride generation gas phase

molecular absorption spectrometry) zur Bestimmung von metallorganischen Verbindungen [127, 128]. Babu und Divakar untersuchten die lipasekatalysierte Synthese von Anthranilsäureestern und erhielten auf diese Weise hilfreiche Informationen zur Wahl der Edukte, mit denen die Ausbeute erhöht werden konnte [129].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Plackett-Burmann-Versuchsdesign zur Identifizierung weiterer, möglicher Einflussfaktoren und deren Auswirkung auf die Gesamtpräzision verwendet, um so die quantitative Reproduzierbarkeit weiter zu verbessern.

6.2 Aufstellung des Plackett-Burman-Versuchsdesigns

Zur Untersuchung sieben verschiedener Einflussfaktoren wurde ein Plackett-Burman-Design mit zwölf Versuchen erstellt. Tabelle 6-1 zeigt den allgemeinen Aufbau dieses Designs. Jede Reihe beschreibt einen Versuch, jede Spalte steht für einen Einflussfaktor bzw. einem sogenannten Dummyfaktor. Den Spalten mit den Nummern 1 bis 7 wurden die untersuchten Einflussfaktoren zugeordnet. Die letzten vier Spalten stellen die Dummyfaktoren dar. Dies sind fiktive Variablen, die keinen Einfluss auf die Zielgröße ausüben und nur zur Bestimmung der Versuchsvarianz dienen. Das hier verwendete Versuchsdesign besteht aus zwölf Versuchen, es sind aber auch Plackett-Burman-Designs mit 8, 16, 20 bis zu 100 Versuchen denkbar. Die Anzahl der durchzuführenden Versuche hängt jeweils von der Anzahl der zu untersuchenden Faktoren ab. Bei k zu prüfenden Faktoren sind im Extremfall $k+4$ Versuche erforderlich, die Anzahl der Versuche muss allerdings immer ein Vielfaches von Vier sein.

Tabelle 6-1: Plackett-Burman-Versuchsdesign zur Durchführung von 12 Versuchen.

Nr.	Mittelwert	Einflussfaktoren							Dummyfaktoren				Zielgröße
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	RSD%
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Effekt													

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Faktoren variiert: (i) Färbe- und (ii) Entfärbezeit, (iii) Temperatur, bei der die Färbung durchgeführt wurde, (iv) Temperatur während des Elektrophoreselaufs, (v) Zusammensetzung des Probenpuffers (SDS- und LDS-haltiger Probenpuffer), (vi) Gelalter sowie (vii) Verwendung selbstgegossener (self-casted) und industriell hergestellter (pre-casted) Gele. Von jedem Faktor werden zwei verschiedene Niveaus untersucht, die mit einem Plus- und einem Minussymbol gekennzeichnet sind. Aus der Plackett-Burman-Tabelle (Tabelle 6-1) lässt sich ablesen, auf welches Niveau die jeweiligen Faktoren für den entsprechenden Versuch einzustellen sind. Alle Versuche werden mit einem Grundversuch verglichen, bei dem alle Faktoren sich auf dem unteren Niveau („-“) befinden (Versuchnr. 12, Tabelle 6-1). Die untersuchten Variablen und ihre zugehörigen Niveaus sind in Tabelle 6-2 zusammengefasst.

Tabelle 6-2: Einflussfaktoren und ihre zugehörigen Niveaus, die mittels des Plackett-Burman-Designs untersucht wurden.

Einflussfaktoren	Niveaus	
	-	+
1 Färbezeit	1 Stunde	5 Stunden
2 Entfärbezeit	2 Stunden	20 Stunden
3 Temperatur der Färbung/Färbelösungen	Kühlschrank (KS)	Raumtemperatur (RT)
4 Temperatur während der Elektrophorese	Kühlschrank (KS)	Raumtemperatur (RT)
5 Probenpuffer	SDS	LDS
6 Gelalter	alt (ca. 6 Wochen alt)	neu (frisch gegossen)
7 Gel	pre-casted	self-casted

Bei der Durchführung eines Plackett-Burman-Designs wird vorausgesetzt, dass die untersuchten Faktoren voneinander unabhängig sind, also keine Wechselwirkungen

zwischen ihnen herrschen. Weiterhin wird Linearität zwischen dem unteren („-“) und dem oberen („+“) Niveau eines jeden Faktors angenommen. Die Versuche des Designs werden in randomisierter Reihenfolge durchgeführt, um so das Risiko systematischer Fehler zu reduzieren. Für jeden Versuch wird die Zielgröße ermittelt und in die letzte Spalte der Plackett-Burman-Tabelle eingetragen.

6.3 Bewertung der Einflussfaktoren

Ob und wie die untersuchten Einflussfaktoren die Zielgröße beeinflussen, wird über die berechneten Effekte E_k eines Faktors k abgeschätzt. Zur Berechnung des Effektes wird zunächst in jeder Spalte, sowohl für die Einfluss- als auch für die Dummyfaktoren, die Summe aller Werte (Zielgröße) mit dem Vorzeichen „+“ sowie die Summe aller Werte mit dem Vorzeichen „-“ berechnet, diese jeweils durch die Anzahl der „+“- bzw. „-“-Zeichen dividiert und schließlich die Differenz dieser beiden Summen gebildet (Gleichung 44).

$$E_k = \frac{\sum Y_{k(+)} }{N/2} - \frac{\sum Y_{k(-)} }{N/2} \quad (\text{Gleichung 44})$$

E_k : berechneter Effekt eines Faktors k

Y_k : ermittelte Zielgröße eines Faktors k

N : Anzahl der Versuche

Die Bewertung der berechneten Effekte kann entweder graphisch oder durch eine statistische Interpretation erfolgen. Zur graphischen Bewertung stehen zwei verschiedene Methoden zur Verfügung, zum einen die Bewertung mittels eines Wahrscheinlichkeitsnetzes [130, 131] und zum anderen mittels eines Balkendiagrammes [114]. Bei der statistischen Interpretation wird ein Grenzwert berechnet, der anschließend mit den berechneten Effekten der einzelnen Faktoren verglichen wird. Dieser Grenzwert kann für eine objektivere Bewertung zusätzlich in die Diagramme eingezeichnet werden.

Die Berechnung der Versuchsvarianz erfolgt über die Effekte der Dummyfaktoren, aus denen zunächst nach Gleichung 45 die Standardabweichung $\hat{\sigma}$ der Effekte berechnet wird.

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum E_{(Di)}^2}{n}} \quad (\text{Gleichung 45})$$

E_{Di} : Effekt eines Dummyfaktors

n : Anzahl der Dummyfaktoren

Jeder Effekt E_k eines Faktors k wird mit dem Minimum Significant Factor Effect (MIN), einem Grenzwert, der die Versuchsvarianz innerhalb des Designs beschreibt, verglichen. Dieser MIN-Wert errechnet sich durch Multiplikation der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ (Gleichung 45) mit dem t-Wert einer gewissen Irrtumswahrscheinlichkeit α (Gleichung 46). Jeder Faktoreffekt, dessen Absolutwert größer ist als der MIN-Wert ($|E_k| > \text{MIN}$), gilt als signifikant.

$$\text{MIN} = \hat{\sigma} \cdot t \quad (\text{Gleichung 46})$$

6.4 Ergebnisse und Diskussion des Plackett-Burman-Versuchsdesigns

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit bzw. Präzision wurde die prozentuale relative Standardabweichung (RSD%) der Peakflächen als Zielgröße definiert. Für jedes Experiment wurde ein Gel vorbereitet, auf dem sechs Bahnen bestehend aus jeweils zehn Proteinen aufgetrennt wurden. Jede Bahn enthält die Probe (Mark 12TM Standardlösung, Invitrogen) in einer Proteingesamtkonzentration von 0,309 µg/µL. Die getrennten Proteine wurden mit einem Coomassie-Farbstoff (BioSafeTM Coomassie, BioRad) angefärbt und anschließend mit dem NIR-Detektor (Odyssey, LiCor) eingescannt. Abbildung 6-1 zeigt solch ein typisches Gelbild, wie es für die Untersuchungen zur Präzision eingesetzt wurde. Jeder Versuch wurde zweimal durchgeführt und jedes Gel fünfmal eingescannt. Alle Gelbilder wurden, wie oben beschrieben, in Elektropherogramme umgewandelt (vgl. Kapitel 3.6). Für jedes Experiment erhält man so 60 verschiedene Elektropherogramme, aus denen für

jedes Protein der Mittelwert gebildet wurde. Von den zehn aufgetrennten Proteinen wurden jedoch nur sieben (vgl. Tabelle 8-12, Kapitel 8 Experimenteller Teil, Proteinnummer 2-8), die in der Mitte des Geles lokalisiert sind, für die Bewertung herangezogen.

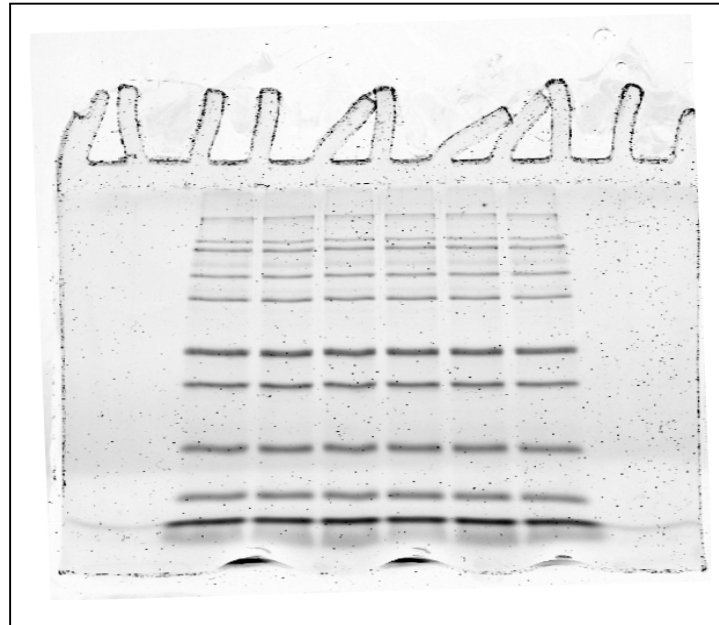


Abbildung 6-1: Typisches Gelbild zur Untersuchung der Präzision mit Hilfe des Plackett-Burman-Versuchsdesigns.

Als Zielgröße wurde für jedes Protein die prozentuale relative Standardabweichung der Peakflächen aus den 60 Elektropherogrammen berechnet und in die letzte Spalte der Plackett-Burman-Tabelle eingetragen. Aus diesen RSD%-Werten wurden anschließend, wie in Abschnitt 6.3 erläutert, die Effekte berechnet. Die für jedes Protein ermittelten Plackett-Burmann-Tabellen sind im Anhang aufgelistet. Eine Zusammenfassung der ermittelten RSD%-Werte ist in Tabelle 6-3 und der berechneten Effekte sowie der zugehörigen MIN-Werte in Tabelle 6-4 dargestellt.

Tabelle 6-3: Ergebnisse des Plackett-Burman-Designs; berechneten RSD%-Werte für jedes Protein.

Versuchs- Nr.	β -Galactosidase	Phosphorylase B	BSA	Glutamat- dehydrogenase	Laktat- dehydrogenase	Carbo- anhydrase	Trypsin Inhibitor
1	19,5	7,8	9,0	4,3	3,7	6,1	5,5
2	6,6	5,0	5,8	5,4	4,6	4,0	5,6
3	9,0	5,0	7,7	7,4	6,3	5,9	5,2
4	11,5	4,2	4,0	6,1	3,8	3,3	3,2
5	17,7	12,0	18,5	10,2	8,0	8,1	9,9
6	6,9	26,2	8,1	9,4	5,4	5,8	6,5
7	5,3	6,4	5,3	7,9	5,3	3,8	5,5
8	7,0	7,9	10,9	12,8	5,4	3,9	8,9
9	23,3	20,0	12,6	8,2	3,9	7,1	5,7
10	6,8	6,6	8,8	7,0	5,7	6,8	9,0
11	8,9	7,7	6,4	7,0	3,8	3,9	10,1
12	7,4	7,2	11,2	5,3	3,5	3,7	6,0

Tabelle 6-4: Ergebnisse des Plackett-Burmann-Designs; berechnete Effekte sowie die ermittelten MIN-Werte, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,2$ berechnet wurden. Die Effekte, die als signifikant angesehen werden, sind dickgedruckt. Den Zahlen 1-7 werden die untersuchten Effekte gemäß Tabelle 6-2 zugeordnet.

Protein	1	2	3	4	5	6	7	MIN
β-Galactosidase	1,3667	8,3000	-5,0667	1,8500	2,4167	0,0833	-0,7500	3,7965
Phosphorylase B	1,2667	-0,4500	-7,2167	-2,4000	5,5500	-3,1833	4,3667	5,1939
BSA	0,0167	1,3500	-3,5333	-1,6500	-0,4500	1,5833	-3,0000	4,0837
Glutamat-								
dehydrogenase	-1,0417	-0,7583	0,0250	-1,7583	0,5250	1,2250	0,0250	2,8649
Laktatdehydrogenase	0,4833	-0,0500	-0,0500	-0,0667	-0,9667	0,7167	-0,5833	1,6124
Carboanhydrase	0,9583	1,0750	-1,1583	0,8417	-0,1250	0,4583	-0,1750	1,7651
Trypsin Inhibitor	-0,2750	-0,3417	0,4917	-1,3583	0,5917	2,7917	-0,1750	2,0090

In der Regel lässt sich die Berechnung des Grenzwertes zur Identifizierung signifikanter Effekte von der t-Verteilung ableiten. Die t-Verteilung dient jedoch nur zur Bewertung von Lageparametern wie z.B. Mittelwert oder Median. Zur Untersuchung der Präzision mit Hilfe des Plackett-Burman-Designs wurde jedoch die relative Standardabweichung, also ein Streuparameter, gewählt. Die statistische Interpretation der Zielgröße, die auf der t-Verteilung beruht, ist daher mit größter Sorgfalt vorzunehmen. Aufgrund dessen wurde zunächst die graphische Auswertung mittels Balkendiagrammen bevorzugt. In Abbildung 6-2 sind die Balkendiagramme der einzelnen Proteine dargestellt. Die Balken demonstrieren die Absolutwerte der berechneten Effekte. Wie stark ein Faktor die Präzision beeinflusst, kann somit über die Höhe des Balkens beurteilt werden.

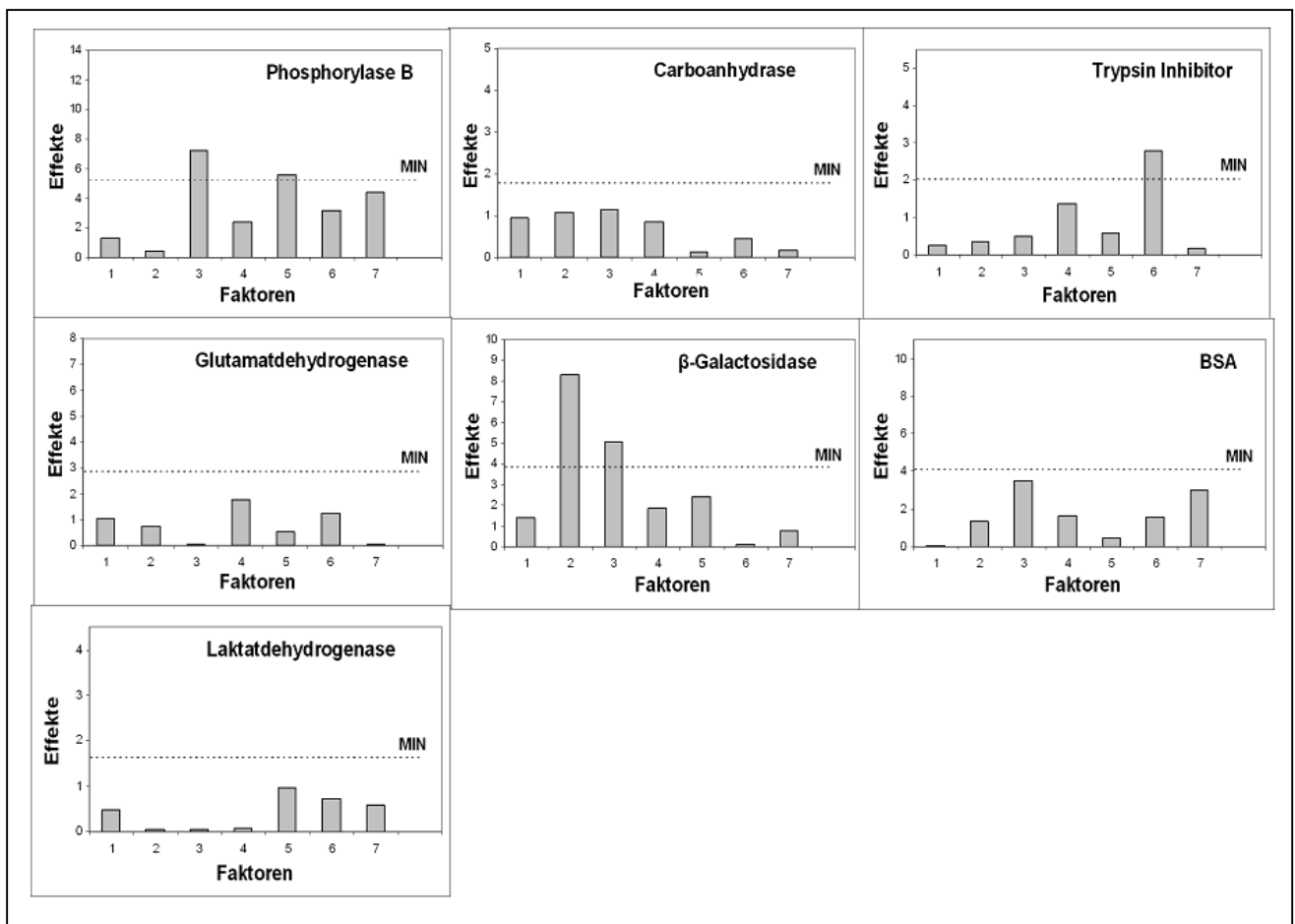


Abbildung 6-2: Balkendiagramme der Effekte jedes einzelnen Proteins. Die Balken stellen die Absolutwerte der berechneten Faktoren dar, die gestrichelte Linie die berechneten Grenzwerte (Minimum Significant Factor Effect (MIN)); den Zahlen 1-7 werden die untersuchten Effekte gemäß Tabelle 6-2 zugeordnet.

Zum Vergleich wurden in die Diagramme zusätzlich die über die t-Verteilung berechneten Grenzwerte (MIN-Wert) als horizontale, gestrichelte Linie eingetragen. Zur Berechnung dieses Grenzwertes wurde eine relativ hohe Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 20\%$ angenommen. Dafür wird man mit einem relativ geringen β -Fehler belohnt, d.h. die Wahrscheinlichkeit, einen untersuchten Faktor nicht als signifikant zu identifizieren, obwohl dieser einen signifikanten Einfluss auf die Präzision ausübt, ist sehr gering. Die Wahrscheinlichkeit, eine falsch negative Entscheidung zu treffen, wurde somit extrem reduziert. Der direkte Vergleich der graphischen und statistischen Interpretation in Abbildung 6-2 zeigt, dass beide Bewertungsmethoden zu denselben Ergebnissen führen.

Abbildung 6-2 und Tabelle 6-4 verdeutlichen, dass für jedes Protein komplett unterschiedliche Faktoren als signifikant angesehen werden können. Bei der β -Galactosidase haben sowohl die Färbezeit als auch die Temperatur während der Färbung einen großen Einfluss auf Präzision der Peakflächen. Die Reproduzierbarkeit der Phosphorylase B wird zum einen auch durch die Färbetemperatur, zum anderen aber durch das Detergenz (SDS oder LDS), welches dem Probenpuffer zugesetzt wurde, beeinflusst. Das Alter der Gele spielt wiederum eine wichtige Rolle bei der Quantifizierung des Trypsin Inhibitors.

Die Detektion der Glutamatdehydrogenase, BSA, Laktatdehydrogenase und der Carboanhydrase scheint relativ unempfindlich gegen äußere Einflüsse bzw. Veränderungen zu sein. Die Färbezeit, Temperaturänderungen während der Elektrophorese sowie die Art des Geles (self- oder pre-casted Gel) zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Präzision der untersuchten Proteine. Diese Parameter können somit bei einer weiteren Untersuchung außer Acht gelassen werden.

Sieben Proteine mit komplett unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften wurden systematisch mit Hilfe des Plackett-Burman-Versuchsdesigns untersucht. Aus den Versuchen ließen sich jedoch keine allgemeingültigen Aussagen über das Verhalten aller Proteine machen. Ein Faktor, der die Präzision eines Proteins beeinträchtigt, übt auf ein anderes Protein überhaupt keinen Einfluss aus. Durch Veränderung der untersuchten Faktoren kann keine allgemeine Optimierung der Präzision in der quantitativen Gelelektrophorese erreicht werden. Stattdessen

verdeutlichen die Ergebnisse des Versuchsdesigns die Individualität der Proteine. Im Folgenden müssen die Proteine über eine schrittweise und detaillierte Untersuchung genau charakterisiert und klassifiziert werden. Durch die Zuordnung der Proteine zu bestimmten Proteinklassen und die Kenntnis ihrer charakteristischen Eigenschaften lassen sich die elektrophoretischen Bedingungen besser an die Trennproblematik anpassen, was zu einer weiteren allgemeinen Verbesserung der Präzision führen wird.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Arbeitsschritte der komplexen Technik der zweidimensionalen Gelelektrophorese eingehende analysiert und beurteilt. Als Hauptfehlerquellen für die unzureichende quantitative Präzision wurden die Detektion bzw. das Sichtbarmachen der getrennten Proteine, der Transfer der Proteine von der ersten auf die zweite Dimension und die Übung und Erfahrung des Analytikers identifiziert.

Für die Detektion der Proteine werden häufig Färbemethoden eingesetzt, die allerdings nicht nur die getrennten Proteine, sondern auch die Gelmatrix verschieden stark anfärben. Es ist besonders schwierig, die optimalen Färbebedingungen zu finden, mit denen die Proteine ausreichend angefärbt und der Gelhintergrund zufriedenstellend entfärbt wird. Starke Schwankungen in der Gelhintergrundfärbung äußern sich in stark schwankenden Basislinien und erschweren dadurch die Festlegung der richtigen Spotgrenzen und somit die Detektion der Proteine. Als direkte Folge sind eine schlechte Empfindlichkeit und Präzision, die in der Literatur als prozentuale relative Standardabweichung von 15 – 60% RSD% [41-45] angegeben ist. Durch Wiederholung des kompletten Färbeprotokolls der RuBPS-Färbung konnte mit dieser Färbemethode eine geringfügige Verbesserung der Reproduzierbarkeit erzielt werden. Allerdings führt dies auch zu einer Verlängerung der ohnehin schon extrem langen Analysenzeiten und bietet somit keine Alternative für die Routineanalytik.

Das Hintergrundsignal kann durch die Verwendung des Odyssey NIR Imaging Systems, welches die emittierte Fluoreszenz der angefärbten, angeregten Proteine im Nahen-Infrarot-Wellenlängenbereich detektiert, deutlich verbessert werden. Gut definierte Peaks und ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis führen zu einer quantitativen Reproduzierbarkeit von 3 – 10% RSD% bei der Detektion CCB-gefärbter Gele mit dem Odyssey NIR Imaging System. Auch mit dem Typhoon Fluoreszenz-Detektor können RSD%-Werte in dieser Größenordnung erreicht werden. Allerdings konnte diese gute Präzision hier nur mit wesentlich höheren Proteinkonzentrationen bestimmt werden.

Die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der Detektionmethode, bestehend aus der Kombination CCB-gefärbter Gele mit dem NIR Imaging System, ist vergleichbar bzw. sogar besser als die der empfindlichen und sehr teuren Fluoreszenzfarbstoffe. Die Fluoreszenz-Detektion im Nahen-Infrarot-Bereich führt zu einem geringen Hintergrundsignal und infolgedessen zu einer verbesserten Empfindlichkeit. Aufgrund der geringen Detektionsgrenze und der guten quantitativen Reproduzierbarkeit als direkte Folge des sehr guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bietet die Kombination aus CCB-gefärbten Gelen und Odyssey NIR Imaging System die empfindlichste und kosteneffizienteste Methode zur Detektion der getrennten Proteine direkt im Gel, die zur Zeit verfügbar ist.

Die direkte Detektion der Proteine aufgrund ihrer Nativen Fluoreszenz bietet weitere Vorteile im Vergleich zu konventionellen Färbemethoden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl gut definierte Peaks als auch ein dreifach besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis einer Probe, die in einer 800-fach geringeren Konzentration eingesetzt wurde, zu einer deutlich besseren Präzision von 12 – 16% RSD% führt. Da für diese Detektionsmethode keine konventionellen Gele eingesetzt werden können, sondern besonders kleine, sogenannten Mikrogele, bietet diese Detektionsmethode neben der Verbesserung der Präzision weitere Vorteile. Zum einen ist die wesentlich kürzere Analysenzeit, bedingt durch die kurze Laufstrecke des Mikrogeles sowie die kurze Detektionszeit ohne lange An- und Entfärbeschritte, zu nennen, zum anderen die wesentlich geringeren Probenmengen, die zur Analyse auf den Mikrogele benötigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die elektrophoretischen Bedingungen zur Trennung der Proteine von Makrogele auf die Mikrogele übertragen werden konnten. Die Detektion selbst bedarf allerdings noch einer weiteren Optimierung. Dennoch stellt diese Detektionsmethode eine vielversprechende Alternative zu den traditionellen Färbemethoden dar, die in naher Zukunft realisierbar ist.

Einen großen Anteil an der Gesamtstreuung macht zusätzlich die Qualifikation des Analytikers aus. Diese Fehlerquelle kann aber durch sehr viel Übung und Erfahrung in der Durchführung der Gelelektrophorese minimiert werden. Dies wirkt sich positiv auf alle Arbeitsschritte der 2-DE aus und verbessert somit deutlich die Präzision. Ausführliche und detaillierte Protokolle helfen ungeübten Analytikern zusätzlich, gute

Präzisionen zu erzielen. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits bestehende Analysenvorschriften ausführlicher und präziser formuliert.

Entsprechend des Fehlerfortpflanzungsgesetzes dominiert die Hauptfehlerquelle den Gesamtfehler. Durch Identifizierung der Detektion als eine dieser Hauptfehlerquellen konnte diese beseitigt und die Präzision erheblich verbessert werden. Weitere, nachrangige Fehlerquellen, die nur einen geringen Einfluss auf die Gesamtstreuung ausüben, werden nun nicht länger durch die Hauptfehlerquelle überdeckt und können im Folgenden identifiziert und optimiert werden. Auch die Optimierung des Proteintransfers von der ersten auf die zweite Dimension kann nun an dieser Stelle erfolgen. Die Verbesserung der Präzision in der quantitativen Gelelektrophorese ist somit ein Prozess, der schrittweise erfolgen muss.

In einem nächsten Schritt wurden daher weitere, nachrangige Varianzkomponenten systematisch mit Hilfe eines Screening-Versuchsdesigns untersucht. Die Hauptfehlerquelle wurde ausgeschaltet, indem zur Detektion CCB-gefärbte Gele in Kombination mit dem Odyssey NIR Imaging System verwendet wurden. Um den Einfluss sieben verschiedener Faktoren auf die Gesamtpräzision zu untersuchen, wurde ein Plackett-Burman-Versuchsdesign anhand von sieben verschiedenen Proteinen mit völlig unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften durchgeführt. Eine allgemein gültige Optimierung für die Proteinquantifizierung durch Veränderung des elektrophoretischen Prozesses ist allerdings nicht möglich. Ein Faktor, der die Präzision eines Proteins beeinträchtigt, übt auf ein anderes Protein überhaupt keinen Einfluss aus. Für jedes Protein wurden unterschiedliche Einflussfaktoren als signifikant identifiziert. Somit ist keine allgemein gültige Aussage zu allen untersuchten Faktoren und keine allgemeine Optimierung der Gelelektrophorese möglich. Stattdessen verdeutlichen die Ergebnisse des Plackett-Burman-Designs die Individualität der Proteine. Insgesamt zeigten nur vier der sieben untersuchten Faktoren einen signifikanten Effekt auf einige Proteine, hierzu zählen: (i) die Entfärbezeit, (ii) die Temperatur der Färbung, (iii) die Verwendung eines SDS- bzw. LDS-haltigen Probenpuffers und (iv) das Alter der Gele.

Eine Verbesserung der Präzision kann nur für jedes Protein individuell erfolgen, und nur, wenn die Eigenschaften des Proteins genau charakterisiert sind. Daher müssen die Proteine im Folgenden über eine schrittweise und detaillierte Untersuchung

genau charakterisiert und klassifiziert werden. Proteineigenschaften wie Zusammensetzung, Form und Struktur, Hydrophilie oder Flexibilität müssen dabei sorgfältig betrachtet werden, um aus diesen Eigenschaften einen Zusammenhang zwischen Protein und den untersuchten Einflussfaktoren zu finden. Bei einer solchen Analyse ist aber auch zu bedenken, dass die Proteine in denaturierter Form analysiert werden. Eine Klassifizierung der Proteine in spezielle Gruppen gemäß ihrer strukturellen und analytischen Eigenschaften, kann dazu dienen, Voraussagen darüber zu machen, welche Proteingruppe auf welchen Faktor reagiert. In diesem Zusammenhang sollten zusätzlich die funktionellen Eigenschaften der Proteine betrachtet werden. Durch eine Zuordnung der Proteineigenschaften zu bestimmten Proteinklassen lassen sich dann die elektrophoretischen Bedingungen besser an die Trennproblematik dieses einzelnen Proteins anpassen und führen so zu einer weiteren allgemeinen Verbesserung der Präzision.

In die Praxis könnte dies folgendermaßen umgesetzt werden: In Anlehnung an die untersuchten Proteine bzw. deren Proteineigenschaften werden vorläufige Proteinuntergruppen definiert und diesen weitere Proteinen zugeordnet, die sich z.B. strukturell sehr ähnlich sind. Die quantitative Reproduzierbarkeit dieser vorläufigen Proteingruppen wird über die Faktoren optimiert, die im Plackett-Burman-Design für diese Gruppe als signifikant identifiziert wurden. Verläuft die Verbesserung der Präzision auf diese Weise nicht erfolgreich, so muss bei einer Stufe zuvor erneut eingesetzt und das Klassifizierungssystem neu überdacht werden. In dem Fließdiagramm in Abbildung 7-1 ist schematisch der Ablauf zur Optimierung der Präzision in der Gelelektrophorese dargestellt.

Ein größeres Verständnis über die Einzigartigkeit der Proteine ermöglicht eine weitere Verbesserung der Präzision in der Gelelektrophorese. Somit sollten relative Standardabweichungen von 2% für die Quantifizierung von Hauptkomponenten innerhalb der nächsten Jahre realisierbar sein.

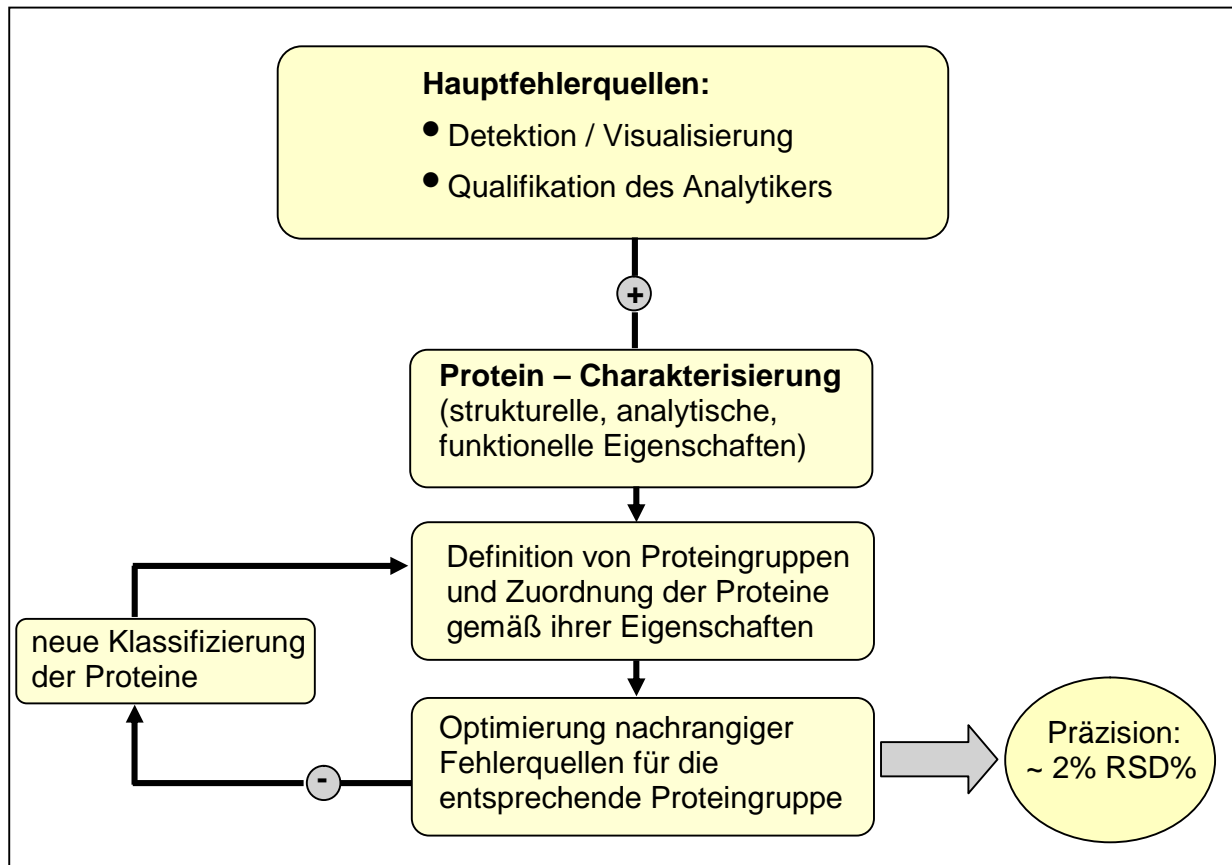


Abbildung 7-1: Fließdiagramm zur Optimierung der Präzision in der Gelelektrophorese.

Trotz einer deutlichen Verbesserung der Präzision können in Messreihen immer wieder Werte auftreten, die stark von den anderen abweichen. Treten solche Extremwerte auf, muss immer eine Fehlersuche erfolgen, die die Ursache dieser Extremwerte (z.B. durch systematische Fehler, fehlerhafte Produktion oder Analytik) klärt. Ausreißertests dienen zur Identifizierung einzelner Daten innerhalb einer Messreihe, die als extrem unwahrscheinlich angesehen werden, und stellen somit ein wichtiges Diagnosewerkzeug bei der Fehlersuche dar. Anhand von simulierten Daten wurde in der vorliegenden Arbeit die Leistungsfähigkeit solcher Ausreißertests bewertet. Mit Hilfe des Box-Plots kann man sich sehr schnell und sehr anschaulich ein Bild über den vorliegenden Datensatz machen und mögliche Ausreißer identifizieren. Allerdings benötigt der Box-Plot eine relativ hohe Anzahl an Stichproben, die nur mit einer geringen Anzahl an Ausreißern kontaminiert sein darf. Auch der Test nach Nalimov benötigt eine relativ hohe Anzahl an Messwerten, um die Ausreißer in den Datensätzen zu erkennen. Die anderen untersuchten Tests sind

allerdings nicht in der Lage, vorliegende Ausreißer als solche zu identifizieren. Mit Hilfe des Bootstrap-Verfahrens sollte ein vereinfachtes, robustes Verfahren zur Ausreißerdetektion entwickelt werden. Dazu wurden aus den vorliegenden Datensätzen viele neue Stichproben gezogen und daraus die zugrundeliegende Verteilung rekonstruiert. Die resultierende Verteilungsfunktion sollte anschließend zur Beurteilung des Datensatzes und zur Ausreißerbestimmung herangezogen werden. Eine eindeutige Bewertung der Datensätze und somit Identifizierung der Ausreißer ist über das Bootstrap-Verfahren bisher noch nicht möglich, mittlerweile liegen jedoch weitere, vielversprechende Untersuchungen zur Ausreißerdetektion vor [107, 108], die auf den sogenannten R-NN Curves [109] beruhen, einer distanzbasierten Methode aus dem Bereich der Cheminformatik.

8 Experimenteller Teil

8.1 Geräte und Software

8.1.1 2D-Gelelektrophorese-System

- IPG-PhorTM – IEF System für die Trennung in der 1. Dimension (isoelektrische Fokussierung), GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA
- IsoDalt Electrophoresis System (vertikales System) für die Trennung in der zweiten Dimension (SDS-PAGE), Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA
- Spannungsquelle: Hoefer EPS 2A 200, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA
- Gradientenmischer, IsoDalt System, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA

8.1.2 1D-Gelelektrophorese-System

Zur Durchführung der eindimensionalen Gelelektrophorese wurden verschiedene Elektrophoresesysteme verwendet:

- Mini-Protean 3 Electrophoresis System, BioRad, Hercules, CA, USA
Spannungsquelle: PowerPac Power Supply, BioRad, Hercules, CA, USA
- Biometra Minigel-Twin, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
Spannungsquelle: Electrophoresis Power Supply EPS 601, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

8.1.3 Mikrogele

- Spannungsquelle: Model 1000/500 Power Supply, BioRad, Hercules, CA, USA
- Laser: Nd-YAG-Laser, Continuum Surelite

8.1.4 Scanner und Detektoren

- CCD-Kamera, Fuji-Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Detektorsoftware: Camilla V 1.00
- Power Look III Scanner, Umax, Willich, Deutschland
Scannersoftware: Silver Fast
- Typhoon Multimode Fluoreszenz Scanner mit Typhoon Scanner Control Software V 3.0 und Typhoon ImageQuant Software V 5.2, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA
- Odyssey Infrared Imaging System, LiCor Biosciences, Lincoln, NE, USA
- Imagescanner-II mit MagicScan Software V 4.6, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA

8.1.5 weitere Geräte

- Eppendorfpipette: Eppendorf Reference 0,5 – 10 µL; Eppendorf 2 – 20 µL; Eppendorf 20 – 200 µL; Eppendorf 100 - 1000 µL; Roth 200 – 1000 µL
- Waagen: Präzisionswaage Sartorius I 200 D
Analysenwaage Mettler Toledo AG 204
- Schüttler: Bühler Schüttler SM 25, Edmund Bühler Laborgerätebau, Tübingen, Deutschland
GFL 3016, Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel, Deutschland
Rocker II Shaker, Boekel Scientific, Feasterville, PA, USA
- Vortex Schüttler VV3, VWR, Darmstadt, Deutschland
- pH-Meter: Orion 3 Star pH-Meter mit einer Orion Ross Ultra Combination-Elektrode, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
- Cary Eclipse – Spektrophotometer, Varian, Darmstadt, Deutschland

8.1.6 Software

- Proteomweaver™ 2D-Analysis Software Version 4.0, BioRad, München, Deutschland
- KISS [73]
- MATLAB 6.1, The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA

8.2 Reagenzien und Chemikalien

Für die Herstellung aller Lösungen wurde Wasser verwendet, welches mit einer Milli-Q Anlage aufbereitet wurde. Folgende Milli-Q Systeme wurden verwendet:

- Milli-Q Purification System, Membra Pure Astacus, Germany
- Millipore Milli-Q Synthesis Purification System, Billerica, MA, USA

Tabelle 8-1: Verwendete Proteine und Standardlösungen.

Protein	Hersteller	Artikelnummer
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A – 7638
Catalase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	C – 9322
Cytochrom C	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	C – 2506
Glucoseoxidase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	G – 7016
β-Lactoglobulin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	L – 2506
Mark 12™ Standard- lösung (vgl. Tab. 8-12)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	LC 5677
Myoglobin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	M – 1882
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A – 5503
Pepsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	P – 6887
Phosphorylase B	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	P – 6635
Precision Plus Protein™ Standard	BioRad, Hercules, CA, USA	161 - 0375
Ribonuclease	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	R - 5756
Tryptophan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	T - 0254

Tabelle 8-2: Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Artikelnummer
40% Acrylamide/bis (37,5:1) Lösung	BioRad, Hercules, CA, USA	161 - 0148
Agarose	Serva Elektrophorese GmbH, Heidelberg, Deutschland	11408
Aluminiumsulfat	Fluka, Steinheim, Deutschland	06421
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland	3746.4
Ammoniumpersulfat	Serva Elektrophorese GmbH, Heidelberg, Deutschland	13375
Biosafe™	BioRad, Hercules, CA, USA	161 - 0786
Coomassie		
Borsäure	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA	A73-1
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.11746
CHAPS	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	50058-2
Coomassie BB- G250	Serva Elektrophorese GmbH, Heidelberg, Deutschland	17524
Deep Purple	GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA	RPN6305
DTT	Serva Elektrophorese GmbH, Heidelberg, Deutschland	20710
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland	3738.5
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande	8006
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland	4043.3
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland	3908.2
Harnstoff	BioRad, München, Deutschland	161 – 0731
Immobiline™ Dry Strip pH 3 – 10 (180 x 3 x 0,5 mm)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland	17 – 1234 – 01
IPG-Puffer pH 3 - 10	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland	17 – 6000 – 87
Jodacetamid	Fluka, Steinheim, Deutschland	57670
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland	444204
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande	8045

Natronlauge	Roth, Karlsruhe, Deutschland	6771.1
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland	9079.2
Proteaseinhibitor- Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	11 873 580 001
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	3029.1
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.09060
SDS	BioRad, München, Deutschland	161 - 0302
Silikonöl	Roth, Karlsruhe, Deutschland	4025.1
SYPRO Ruby	BioRad, Hercules, CA, USA	170 – 3125
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland; BioRad, Hercules, CA, USA	2367.3
Thioharnstoff	Fluka, Steinheim, Deutschland	88810
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland	9090.2
Zitronensäure	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA	A940-1

Tabelle 8-3: Gebrauchsfertige Pufferlösungen.

Puffer	Hersteller	Artikelnummer
TRIS-HCl Puffer (pH 6,8; 0,5 M)	BioRad, Hercules, CA, USA	161 – 0799
TRIS-HCl Puffer (pH 8,8; 1,5 M)	BioRad, Hercules, CA, USA	161 – 0798
XT Sample Buffer	BioRad, Hercules, CA, USA	161 – 0791
Laemmli Sample Buffer	BioRad, Hercules, CA, USA	161 – 0737
Novex® Tris-Glycine SDS Running Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	LC 2675
NuPAGE® MES SDS Running Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	NP 0002
TRIS-Glycine SDS Running Buffer	BioRad, Hercules, CA, USA	161 – 0732

Tabelle 8-4: Verwendete, industriell hergestellte (pre-casted) Gele.

Gel	Hersteller	Artikelnummer
12% Tris-HCl Ready Gel NuPAGE® Novex® 4 - 12% Bis-Tris Midi Gele (1,0 mm x 20 well)	BioRad, Hercules, CA, USA Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	161 - 1102 WG1402BOX
Novex® 4 - 20% Tris-Glycine Midi Gele (1,0 mm x 20 well)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	WT4202BOX

Tabelle 8-5: Vergleich der verschiedenen Coomassie-Färbelösungen.

klassische Neuhoff- Methode [57]	Coomassie-Silver nach Candiano [69]	Coomassie-Färbung nach Kang [80]
2% Phosphorsäure	10% Phosphorsäure	2% Phosphorsäure
10% Ammoniumsulfat	10% Ammoniumsulfat	5% Aluminiumsulfat
20% Methanol	20% Methanol	10% Ethanol
0,1% CBB G-250	0,12% CBB G-250	0,02% CBB G-250

8.3 2D-Gelelektrophorese

8.3.1 Probenvorbereitung

Die Proteinlösung für die Untersuchungen der 2-DE bestand aus den in Tabelle 8-6 aufgelisteten Proteinen und den entsprechenden Einwaagen, die in 30 mL Quellsolution gelöst wurden. Zur Herstellung der Quellsolution wurden zunächst 5,4 g Harnstoff in 10 mL Wasser vollständig gelöst. Zu dieser Lösung wurde ca. 1 g Serdolit MB-1 (Ionenaustauscher) gegeben und die Suspension 10 Minuten lang gerührt und anschließend durch einen Faltenfilter filtriert. In dieser filtrierten Lösung wurden anschließend 1,5 g Thioharnstoff, 400 mg CHAPS, 17 µL einer 1M-Tris-Lösung, 46 mg DTT, 10 µL einer Leupeptin- (1 mg / mL) und 100 µL einer Pefablock-

lösung (2,4 mg / mL) gelöst. Diese Proteinlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 8-6: Verwendete Proteine und deren Einwaagen zur Herstellung der Probelösung für die 2D-Gelelektrophorese.

Protein	Mr [kDa]	pI	Einwaage [mg]
BSA	67,0	6,3 – 6,5	1,06
Catalase	58,0	7,3	0,98
Cytochrom C	11,7	9,8	1,12
Glucoseoxidase	77,0	5,5	1,07
β-Lactoglobulin	18,4	5,5	1,09
Myoglobin	17,8	7,5	0,90
Pepsin	34,6	3,2	1,17
Ribonuclease B	13,7	9,3	0,90

8.3.2 Isoelektrische Fokussierung

Die Trennung in der ersten Dimension erfolgte mit IPG-Streifen (180 x 3 x 0,5 mm) über einen pH-Bereich von pH 3-10 in Keramikscheffchen in einem IPGPhorTM-IEF System. Die Rehydratisierung und Beladung der IPG-Streifen erfolgte in einem Schritt (Rehydratisierungsbeladung). Mit einer Mischung aus 375 µL der unter 8.3.1 hergestellten Proteinlösung, 5 µL IPG-Puffer (pH 3 - 10) und 2 µL einer Bromphenolblaulösung wurde jeder IPG-Streifen folgendermaßen beladen: Nachdem auf die Elektroden der Keramikscheffchen ein Filterplättchen gelegt wurde und diese jeweils mit 20 µL Quellsolution befeuchtet wurden, wurde die Probelösung in die Mitte des Scheffchens gegeben. Der IPG-Streifen wurde anschließend, mit der Gelseite nach unten, blasenfrei auf die Probe gelegt, wodurch diese sich unter dem Gel verteilte (Abbildung 8-1). Dabei ist darauf zu achten, dass die Probe nicht über die Elektroden läuft. Sobald die Probelösung die Elektrode erreichte, wurde dieser Bereich und schließlich der gesamte IPG-Streifen mit Silikonöl abgedichtet. Zur Rehydratisierung des IPG-Streifens wurde über 14 Stunden eine Spannung von 30 V

angelegt. Während der IEF wurde die Spannung über einen Gradienten langsam auf 8000 V erhöht. Die IEF wurde nach 200 kVh gestoppt. Das komplette Protokoll der isoelektrischen Fokussierung ist in Tabelle 8-7 zusammengefasst.

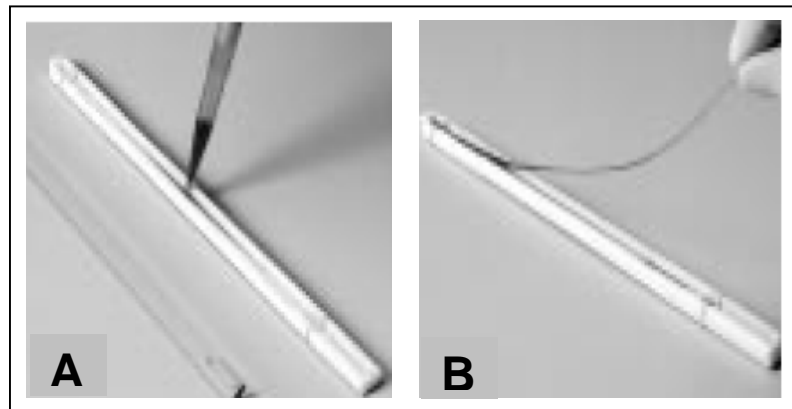


Abbildung 8-1: Beladen der IPG-Streifen. (A) Befüllen der Keramikschißchen mit der Proteinprobelösung und (B) Positionierung der IPG-Streifen im Keramikschißchen.

Tabelle 8-7: Protokoll der isoelektrischen Fokussierung für die Trennung in der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophoreseexperimente.

IEF-Schritte	Zeit	Spannung	
Rehydratisierung	14 h	30 V	konstant
Schritt 1	3 h	100 V	Gradient
Schritt 2	3 h	300 V	Gradient
Schritt 3	3 h	3000 V	Gradient
Schritt 4	1 h	5500 V	Gradient
Schritt 5	20 h	5500 V	konstant
Schritt 6	2 h	8000 V	Gradient
Schritt 7	bis zum Ende	8000 V	konstant

8.3.3 Äquilibration

Die Äquilibrationlösung enthält 50 mM Tris/Cl, 6 M Harnstoff, 30% (m/V) Glycin und 2% (m/V) SDS. In den IPG-Streifenhalter werden pro Bahn zwei IPG-Streifen in 3 mL Äquilibrationlösung in zwei aufeinanderfolgenden Schritten äquilibriert. Im ersten Schritt wird der Lösung 1% (m/V) DTT hinzugefügt und über 10 Minuten geschüttelt. In einem zweiten Schritt enthält die Äquilibrationlösung anstelle des DTT 4,8% (m/V) Jodacetamid und wird erneut 10 Minuten geschüttelt.

8.3.4 SDS-PAGE

Die Trennung in der zweiten Dimension erfolgte mit 12 – 15% Polyacrylamid-gradientengelen (18 cm x 20 cm x 1 mm) in einem vertikalen IsoDalt Elektrophoresesystem. Die Gradientengele wurden mit einem Gradientenmischer hergestellt, indem zwei Acrylamidlösungen verschiedener Konzentrationen, eine leichte und eine schwere Acrylamidlösung, vermischt wurden. Die Zusammensetzung der beiden Acrylamidlösungen ist in Tabelle 8-8 zusammengefasst. Die IPG-Streifen wurden in der Mitte des SDS-Geles positioniert und mit einem 1%-igen Agarosegel fixiert (vgl. Abbildung 1-15). Zur Herstellung des Agarosegels wurde Agarose (1% (m/V)) im Laufpuffer unter Erwärmen und Zusatz von einem Tropfen einer Bromphenolblaulösung gelöst. Der Laufpuffer setzte sich folgendermaßen zusammen: 24 mM Trisbase, 0,2 M Glycine und 0,1% (m/V) SDS. Zu Beginn der Trennung wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt, die nach einer Stunde auf 100 Volt erhöht wurde. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die Lauffront, markiert durch Bromphenolblau, einen Bereich erreichte, der etwa 2 cm von der unteren Gelkante entfernt lag. Während der gesamten Elektrophorese wurde das System auf eine Temperatur von 10 °C gekühlt.

Tabelle 8-8: Zusammensetzung der Acrylamidlösungen zur Herstellung der Polyacrylamidgradientengele.

	leichte Acrylamid-Lösung (12%)	schwere Acrylamid-Lösung (15%)
Acrylamid 30%	428,57 mL	535,71 mL
Puffer D*	275,0 mL	275,0 mL
Wasser	372,86 mL	184,37 mL
10% (m/V) SDS	11,0 mL	11,0 mL
Glycerol (87%)	-----	88,0 mL
10% (m/V) APS	11,0 mL	5,5 mL
10% (V/V) TEMED	1,57 mL	0,42 mL

* 181,6 g/L Tris-Base werden mit Salzsäure auf pH 8,6 eingestellt.

8.3.5 Detektion

Die Gele wurden zunächst in einer Lösung, bestehend aus 30% (V/V) Ethanol und 10% (V/V) Essigsäure, über einen Zeitraum von 24 Stunden im Schüttler fixiert. Danach wurden die Gele zweimal für je 30 Minuten mit Wasser gespült und anschließend über eine Zeit von weiteren 24 Stunden mit der RuBPS-Färbelösung im Dunkeln geschüttelt und schließlich in der Fixierungslösung (30% (V/V) Ethanol, 10% (V/V) Essigsäure) über 24 Stunden unter leichtem Schütteln entfärbt. Mit Hilfe einer CCD-Kamera wurde das Gelbild bei einer Anregungswellenlänge von 420 nm digitalisiert.

Die RuBPS-gefärbten Gele wurden anschließend noch nach der Coomassie Blue Silver Methode [69] angefärbt. Dazu wurden die Gele zunächst über 24 Stunden in der Coomassie Blue Silver Färbelösung (vgl. Tabelle 8-5 verschiedene Coomassie-Färbungen) geschwenkt und anschließend mit Wasser über 48 Stunden entfärbt. Während der Entfärbung wurde das Wasser zweimal, nach 2 Stunden und nochmals nach 24 Stunden, gewechselt. Die so gefärbten Gele wurden anschließend mit dem Power Look III-Scanner eingescannt.

8.4 1D-Gelelektrophorese

8.4.1 Untersuchung des Gelhintergrundes

8.4.1.1 Probenvorbereitung

Es wurde eine Proteinlösung hergestellt, die die folgenden Proteine enthält: Phosphorylase B (Mr 97,0 kDa), Glucoseoxidase (Mr 77,0 kDa), BSA (Mr 66,2 kDa) und Ovalbumin (Mr 45,0 kDa). Von jedem Protein wurden 0,5 mg/mL in einem SDS-Probenpuffer, bestehend aus 10% (m/V) SDS, 5% 2-Mercapto-Ethanol und 0,5 M Tris-HCl, gelöst. Der pH-Wert des SDS-Puffers wurde auf pH 6,8 eingestellt.

8.4.1.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde auf Gelen der Größe 7 cm x 7 cm x 1 mm in einem Biometra Minigel-System durchgeführt. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist in Tabelle 8-9 zusammengefasst. Zu Beginn der Elektrophorese wurde eine Spannung von 120 V angelegt, die nach 15 Minuten auf 180 V erhöht wurde. Die Elektrophorese wurde gestoppt, als die Lauffront einen Bereich, 1 cm von dem Gelelede entfernt, erreichte. Ein Liter Laufpuffer enthielt 2,9 g Tris-Base, 14,98 g Glycin und 1,0 g SDS.

Tabelle 8-9: Zusammensetzung der SDS-Gele, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel.

	Trenngel (11%)	Sammelgel (4%)
Gelpuffer A	3,75 mL	-----
Gelpuffer B	-----	2,5 mL
Acrylamid 30%	6,0 mL	1,4 mL
Wasser	6,25 mL	6,2 mL
TEMED	30,0 µL	50,0 µL
APS 10% (m/V)	75,0 µL	80,0 µL

Der Gelpuffer A bestand aus 181,7 g/L Tris-HCl, 4 g/L SDS und wurde auf einen pH-Wert von pH 8,8 eingestellt. Der Gelpuffer B setzte sich folgendermaßen zusammen: 60,6 g/L Tris-HCl, 4 g/L SDS bei einem pH-Wert von 6,8.

8.4.2 Umsetzung der Nativen Fluoreszenz-Detektion

Für die Umsetzung der Nativen Fluoreszenz-Detektion wurde zunächst nur Albumin, gelöst im SDS-Probenpuffer, verwendet. Die Mikrogele wurden mit verschiedenen Volumina (0,5 – 1,2 µL) und verschiedenen Albuminkonzentrationen (0,2 – 1,6 µg) beladen. Zur Überprüfung der Trennung bzw. des Laufs wurden die Gele mit der Coomassie Färbung nach Kang [80] angefärbt (vgl. Tabelle 8-5).

Tabelle 8-10 : Verwendete Puffer.

Puffer	Reagenzien	
SDS-Probenpuffer	4 mL	10% (m/V) SDS-Lösung
	600 µL	Puffer B
	4 mL	Glycerin
	400 µL	2-Mercapto-Ethanol
	3 mL	Wasser
Puffer A (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	181,7 g/L	Tris-HCl
	4,0 g/L	SDS
Puffer B (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	60,6 g/L	Tris-HCl
	4,0 g/L	SDS
SDS-Laufpuffer	2,9 g/L	Tris-HCl
	14,98 g/L	Glycin
	1,0 g/L	SDS

Tabelle 8-11: Zusammensetzung eines Mikrogeles. Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele in Anlehnung an die unter 8-4 verwendeten Gele für die 1D-Gelelektrophorese-Experimente (vgl. Tabelle 8-9).

	Trenngel (11%)	Sammelgel (4%)
Gelpuffer A	187,5 µL	-----
Gelpuffer B	-----	125,0 µL
Acrylamid 30%	300,0 µL	70,0 µL
Wasser	312,5 µL	310,0 µL
TEMED	3,0 µL	3,0 µL
APS 10% (m/V)	7,0 µL	5,0 µL

8.4.2.1 Coomassie-Färbung nach Kang

Bei der Coomassie-Färbung nach Kang entfällt der zusätzliche Fixierungsschritt. Stattdessen werden die Proteine während der Färbung fixiert (Ein-Schritt-Färbung). Zunächst wurden die Mikrogele zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend über einen Zeitraum von 14 Stunden in die Färbelösung nach Kang (Zusammensetzung siehe Tabelle 8-5) eingelegt. Nach Abnehmen der Färbelösung wurden die Gele dreimal mit Wasser gespült und für weitere sechs Stunden in Wasser entfärbt.

8.4.2.2 Native Fluoreszenz-Detektion

Abbildung 8-2 zeigt den konkreten, experimentellen Aufbau und die verwendeten Geräte zur Detektion der Proteine aufgrund ihrer Nativen Fluoreszenz. Im Folgenden werden die Funktionen der einzelnen Geräte etwas genauer erläutert.

Der Delay-Generator liefert die Zeitbasis für das Experiment und synchronisiert Laser und Kamerasystem. Laserschuss und Belichtung des Sensors können so auf Bruchteile von Sekunden aufeinander abgestimmt werden. Die Belichtungszeit kann

am Controller zwischen 5 ns und 1 ms gewählt werden. Für die Messung der Nativen Fluoreszenz wurde eine Belichtungszeit von 5 ns gewählt, da die Fluoreszenz des Tryptophans sehr schnell abklingt und bei längeren Belichtungszeiten das Rauschen nur verstärkt.

Controller/Image Intensifier und die Kamera bilden das ICCD System, welches unter dem Namen „Flamestar 2F“ der Firma La Vision (Göttingen, Deutschland) erhältlich ist. Die Datenaufnahme selbst erfolgt mit der Software DaVis, Version 6.2, La Vision (Göttingen, Deutschland).

Der Laser erzeugt zunächst ein Licht mit einer Wellenlänge von 1064 nm, intern wird dieses Licht durch zwei Verdopplerkristalle (Typ BBOI) in UV-Licht der Wellenlänge von 266 nm (mit einer Pulsenergie von etwa 800 μ J bei einer Pulsdauer von 3 ns) umgewandelt. Der Strahl wird dann mit einem Teleskop aufgeweitet und anschließend mit einer langbrennweitigen Zylinderlinse fokussiert. Vor der Messung wird der Strahl mittels zweier Schlitzblenden parallel zur Geloberfläche ausgerichtet. Der Strahlenquerschnitt beim Eintritt ins Gel beträgt etwa 12 x 0,3 mm.

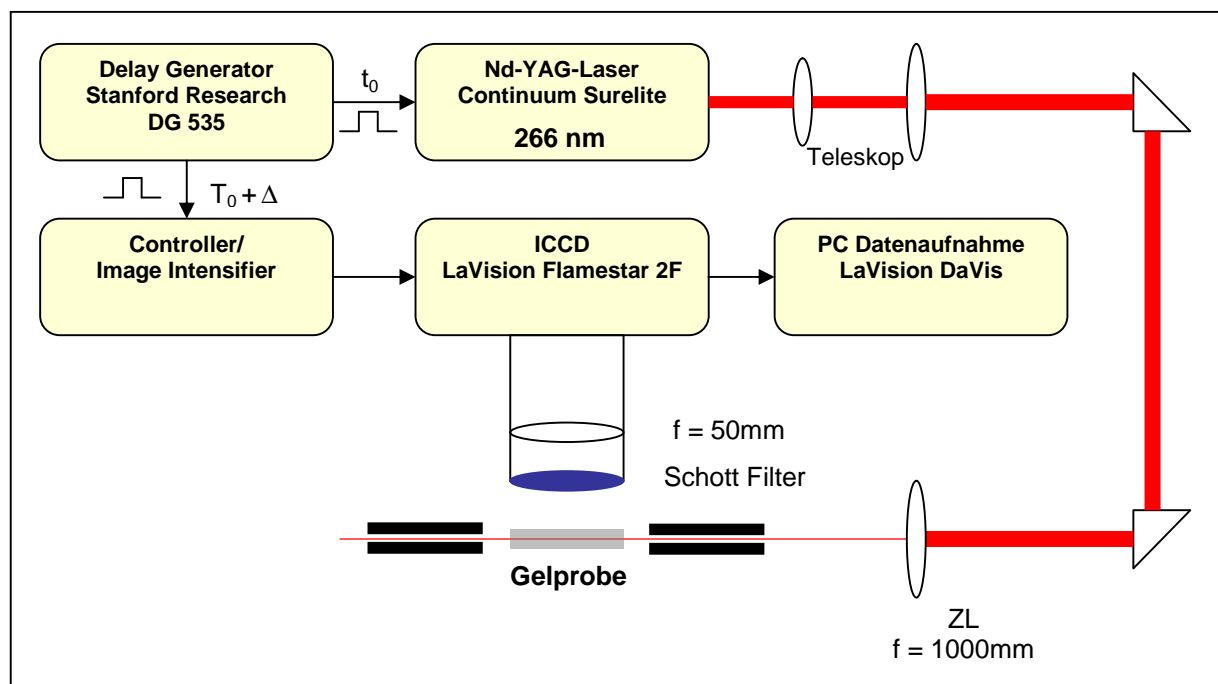


Abbildung 8-2: Experimenteller Aufbau zur Detektion der Nativen Fluoreszenz.

8.4.3 NIR-Detektion

8.4.3.1 Probenvorbereitung

Für die Untersuchungen wurden folgende gebrauchsfertige Proteinstandardlösungen verwendet: (i) Mark 12TM unstained 1D Standard Solution und (ii) pre-stained 1D Precision Plus ProteinTM Standard. Beide Standardlösungen bestehen aus jeweils zwölf Proteinen. Eine detaillierte Zusammensetzung der ungefärbten Mark 12TM Standardlösung ist in Tabelle 8-12 zusammengefasst. Die Proteingesamtkonzentration der vorgefärbten 1D Precision Plus ProteinTM Standardlösung beträgt 1,5 µg/µL. Eine genaue Zusammensetzung ist jedoch nicht bekannt. Die Proteinstandardlösungen wurden mit dem XT Sample Buffer auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt

Tabelle 8-12: Zusammensetzung der Mark 12TM Standardlösung (ungefärbte Proteinstandardlösung) sowie Molekulargewicht und Gehalt der entsprechenden Proteine.

Protein	Mr [kDa]	Konz. [µg/µL]
Myosin (1)	200,0	0,076
β-Galactosidase (2)	116,3	0,040
Phosphorylase b (3)	97,4	0,070
BSA (4)	66,3	0,040
Glutamatdehydrogenase (5)	55,4	0,120
Laktatdehydrogenase (6)	36,5	0,080
Carboanhydrase (7)	31,0	0,044
Trypsin Inhibitor (8)	21,5	0,064
Lysozym (9)	14,4	0,050
Aprotinin (10)	6,0	0,076
Insulin B Kette (64%) (11)	3,5	0,143
Insulin A Kette (35%) (12)	2,5	0,085
Gesamtgehalt		0,888

8.4.3.2 SDS-PAGE

Für die Elektrophorese wurden zwei verschiedene industriell hergestellte (pre-casted) Geltypen verwendet: NuPAGE[®] Novex[®] 4 - 12% Bis-Tris Midi Gele (1,0 mm x 20 well) und Novex[®] 4 - 20% Tris-Glycine Midi Gele (1,0 mm x 20 well). Die SDS-PAGE wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V in einem Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell System unter Verwendung des MES ([2-(N-morpholino)ethane sulfonic acid] SDS) Buffers für die NuPAGE[®]-Gele und des Novex[®] Tris-Glycine SDS Running Buffer für die Novex[®]-Gele durchgeführt. Die Laufpuffer wurden vor Verwendung mit Wasser 1:10 verdünnt. Die Elektrophorese wurde nach 45 Minuten gestoppt, als die Lauffront das untere Gelende erreicht hatte.

8.4.3.3 Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele zweimal für je 5 Minuten mit Wasser gespült und anschließend mit der gebrauchsfertigen BioSafe[™] Coomassie-Lösung angefärbt. Zur Färbung wurden die Gele für zwei Stunden in der Coomassie-Lösung geschwenkt und schließlich mit Wasser über einen Zeitraum von 12 Stunden entfärbt. Anschließend wurden die Gele mit dem Oyssey NIR Imager bei einer Anregungswellenlänge von 685 nm (700 nm-Kanal), dem Typhoon Fluoreszenz-Scanner bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm sowie mit dem Imagescanner-II unter Verwendung von sichtbarem Licht detektiert.

8.4.3.4 Sypro Ruby-Färbung

Die Gele wurden zunächst für 30 Minuten fixiert in einer Lösung, die 10% (V/V) Ethanol und 7% (V/V) Essigsäure enthält. Anschließend wurden die Gele für fünf Stunden unter leichtem Schwenken in 300 mL der gebrauchsfertigen Sypro Ruby-Lösung im Dunkeln angefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte mit der Fixierlösung (10% (V/V) Ethanol, 7% (V/V) Essigsäure) über einen Zeitraum von 12 Stunden. Vor der Detektion mit dem Typhoon Fluoreszenz-Scanner wurden die Gele zweimal für je 5 Minuten mit Wasser gespült.

8.4.3.5 Deep Purple Färbung

Die Gele wurden für eine Stunde in einer Lösung aus 15% (V/V) Ethanol und 1% (m/V) Zitronensäure fixiert. Für die Färbelösung wird zunächst ein Natriumborat-Puffer (100 mM, pH 10,5) hergestellt, indem 6,2 g Borsäure in 800 mL Wasser gelöst, der pH-Wert mit Natronlauge auf pH 10,5 eingestellt und anschließend mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt wurde. Für die Färbelösung wurden ein Teil des Deep Purple Reagenzes und 199 Teile Borat-Puffer gemischt. Mit 500 mL dieser Färbelösung wurden die Gele über einen Zeitraum von 1,5 Stunden gefärbt, anschließend für 30 Minuten in einer ethanolhaltigen Lösung (15% (V/V)) und danach für weitere 30 Minuten mit der Fixierungslösung (15% (V/V) Ethanol, 1% (m/V) Zitronensäure) gewaschen. Vor der Detektion mit dem Typhoon Fluoreszenz-Detektor bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm wurden sie noch einmal für 5 Minuten mit der 15% (V/V)-igen Ethanol-Lösung gewaschen.

8.4.4 Plackett-Burman-Versuchsdesign

8.4.4.1 Probenvorbereitung

Für jeden Plackett-Burman-Versuch wurde eine Mischung aus 49 μL Mark 12TM unstained 1D Standard-Lösung und 91 μL Laemmli Sample Buffer hergestellt, so dass die Probelösung eine Proteingesamtkonzentration von 0,309 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ enthielt. Jede Geltasche wurde mit 10 μL der Probelösung beladen.

8.4.4.2 SDS-PAGE

Ready Gel 12% Tris-HCl sowie selbst gegossene Gele, deren Zusammensetzung in Tabelle 8-13 zusammengestellt ist, wurden für die elektrophoretische Trennung eingesetzt. Die SDS-PAGE wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V in einem Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell System unter Verwendung eines gebrauchsfertigen Tris-Glycine SDS Running Buffers durchgeführt. Der Laufpuffer

wurde vor Verwendung mit Wasser 1:10 verdünnt. Die Elektrophorese wurde nach 45 Minuten gestoppt, als die Laufront die untere Gelkante erreicht hatte.

Tabelle 8-13: Zusammensetzung der selbstgegossenen 1D-Gele.

	Trenngel (12%)	Sammelgel (4%)
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-----	1,9 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	3,8 mL	-----
Acrylamid 40%	4,5 mL	0,7 mL
10% (m/V) SDS	150 µL	75 µL
TEMED	7,5 µL	7,5 µL
10% (m/V) APS	75 µL	37,5 µL

8.4.4.3 Detektion

Nach der Elektrophorese wurden die Gele zweimal für je 5 Minuten mit Wasser gespült und anschließend mit der gebrauchsfertigen BioSafe™ Coomassie-Lösung nach den im Plackett-Burman-Versuchsdesign festgelegten Bedingungen angefärbt. Die gefärbten Gele wurden anschließend mit dem Odyssey NIR Imager bei einer Anregungswellenlänge von 685 nm (700 nm-Kanal) detektiert.

9 Anhang

9.1 Präzisionen und Signal-zu-Rausch-Verhältnisse der verschiedenen Detektoren und Farbstoffe

In den folgenden Tabellen sind die ermittelten Peakflächen, relativen Standardabweichungen und Signal-zu-Rausch-Verhältnisse zusammengefasst, die mit den verschiedenen Färbungen und Detektoren ermittelt wurden (vgl. Kapitel 4.2). Auf jedem Gel wurde ein Probenvolumen von 10 µL sechsmal aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 200 V in einem Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell System über einen Zeitraum von 45 Minuten aufgetrennt.

Tabelle 9-1: Mark¹² unstained Protein Standardlösung aufgetrennt auf einem NuPAGE-Gel und mit der Biosafe™ Coomassie - Färbung angefärbt, Detektor: Odyssey NIR Imaging System.

Protein	Mr [kDa]	Konz. [µg/µL]	Peakfläche			S/N
			Mittelw.	STD	RSD%	
Myosin	200,0	0,027	1,26	0,38	30,49	3,7
β-Galactosidase	116,3	0,014	4,02	0,30	7,37	10,3
Phosphorylase B	97,4	0,025	9,77	0,73	7,50	16,2
BSA	66,3	0,014	10,52	0,93	8,81	21,6
Glutamatdehydrogenase	55,4	0,042	13,78	1,50	1,87	20,3
Laktatdehydrogenase	36,5	0,028	33,60	1,93	5,74	43,9
Carboanhydrase	31,0	0,015	20,64	0,67	3,26	28,3
Trypsin Inhibitor	21,5	0,022	27,40	1,13	4,14	32,9
Lysozym	14,4	0,018	18,89	0,80	4,24	19,3
Aprotinin	6,0	0,027	34,35	2,51	7,32	33,1
Insulin B-Kette (64%)	3,5	0,078	----	----	----	----
Insulin A-Kette (35%)	2,5	----	----	----	----	----
gesamt		0,309				

Tabelle 9-2: Mark¹² unstained Protein Standardlösung aufgetrennt auf einem NuPAGE-Gel und mit der Biosafe™ Coomassie - Färbung angefärbt, Detektor: Typhoon.

Protein	Mr [kDa]	Konz. [µg/µL]	Peakfläche			S/N
			Mittelw.	STD	RSD%	
Myosin	200,0	0,061	1,35	0,10	7,14	6,5
β-Galactosidase	116,3	0,032	3,05	0,15	4,80	12,3
Phosphorylase B	97,4	0,056	6,80	0,64	9,42	17,8
BSA	66,3	0,032	5,78	0,23	4,04	19,7
Glutamatdehydrogenase	55,4	0,096	7,36	0,49	6,69	20,8
Laktatdehydrogenase	36,5	0,064	15,09	0,76	5,03	31,8
Carboanhydrase	31,0	0,035	10,19	0,66	6,52	22,5
Trypsin Inhibitor	21,5	0,051	16,52	1,35	8,16	28,5
Lysozym	14,4	0,040	12,22	0,55	4,46	19,5
Aprotinin	6,0	0,061	16,92	1,34	7,95	22,6
Insulin B-Kette (64%)	3,5	0,179	----	----	----	----
Insulin A-Kette (35%)	2,5	----	----	----	----	----
gesamt	0,707					

Tabelle 9-3: Mark¹² unstained Protein Standardlösung aufgetrennt auf einem NuPAGE-Gel und mit der SYPRO Ruby - Färbung angefärbt, Detektor: Typhoon.

Protein	Mr [kDa]	Konz. [µg/µL]	Peakfläche			S/N
			Mittelw.	STD	RSD%	
Myosin	200,0	0,027	1,74	0,34	19,32	13,2
β-Galactosidase	116,3	0,014	3,24	0,23	7,20	19,0
Phosphorylase B	97,4	0,025	8,09	0,49	6,06	28,6
BSA	66,3	0,014	7,25	0,44	6,07	33,6
Glutamatdehydrogenase	55,4	0,042	9,20	0,50	5,45	38,4
Laktatdehydrogenase	36,5	0,028	21,44	1,37	6,39	66,1
Carboanhydrase	31,0	0,015	14,93	0,56	3,72	53,9
Trypsin Inhibitor	21,5	0,022	23,43	1,22	5,22	70,9
Lysozym	14,4	0,018	18,15	2,28	12,55	45,2
Aprotinin	6,0	0,027	34,33	2,59	7,55	64,8
Insulin B-Kette (64%)	3,5	0,078	----	----	----	----
Insulin A-Kette (35%)	2,5	----	----	----	----	----
gesamt	0,309					

Tabelle 9-4: Mark¹² unstained Protein Standardlösung aufgetrennt auf einem NuPAGE-Gel und mit der Deep Purple - Färbung angefärbt, Detektor: Typhoon.

Protein	Mr [kDa]	Konz. [µg/µL]	Peakfläche		RSD%	S/N
			Mittelw.	STD		
Myosin	200,0	0,053	0,87	0,13	14,64	8,0
β-Galactosidase	116,3	0,028	3,28	0,22	6,74	22,1
Phosphorylase B	97,4	0,049	3,78	0,24	6,40	25,1
BSA	66,3	0,028	5,17	0,41	7,91	30,6
Glutamatdehydrogenase	55,4	0,084	11,62	0,73	6,29	41,7
Laktatdehydrogenase	36,5	0,056	8,55	0,16	1,92	39,3
Carboanhydrase	31,0	0,031	10,23	1,64	16,05	29,1
Trypsin Inhibitor	21,5	0,045	11,75	0,78	6,62	34,9
Lysozym	14,4	0,035	2,18	0,14	6,45	9,0
Aprotinin	6,0	0,053	31,26	2,59	8,28	43,1
Insulin B-Kette (64%)	3,5	0,157	-----	-----	-----	-----
Insulin A-Kette (35%)	2,5	-----	-----	-----	-----	-----
gesamt		0,619				

Tabelle 9-5: Mark¹² unstained Protein Standardlösung aufgetrennt auf einem Tris-Gel und mit der BiosafeTM Coomassie - Färbung angefärbt, Detektor: Odyssey NIR Imaging System.

Protein	Mr [kDa]	Konz. [µg/µL]	Peakfläche		RSD%	S/N
			Mittelw.	STD		
Myosin	200,0	0,027	3,586	0,263	7,3	15,0
β-Galactosidase	116,3	0,014	11,639	0,813	7,0	22,0
Phosphorylase B	97,4	0,025	15,638	1,585	10,1	36,3
BSA	66,3	0,014	14,593	0,996	6,8	44,5
Glutamatdehydrogenase	55,4	0,042	44,296	3,148	7,1	38,8
Laktatdehydrogenase	36,5	0,028	31,228	1,964	6,3	83,7
Carboanhydrase	31,0	0,015	47,481	2,862	6,0	70,0
Trypsin Inhibitor	21,5	0,022	49,484	5,166	10,4	88,8
Lysozym	14,4	0,018	62,998	7,850	12,5	100,2
Aprotinin	6,0	0,027	10,048	3,003	29,9	105,7
Insulin B-Kette (64%)	3,5	0,078	-----	-----	-----	-----
Insulin A-Kette (35%)	2,5	-----	-----	-----	-----	-----
gesamt		0,309				

Tabelle 9-6: Mark¹² unstained Protein Standardlösung aufgetrennt auf einem Tris-Gel und mit der BiosafeTM Coomassie - Färbung angefärbt, Detektor: Typhoon.

Protein	Mr [kDa]	Konz. [µg/µL]	Peakfläche		RSD%	S/N
			Mittelw.	STD		
Myosin	200,0	0,044	1,354	0,286	21,1	10,0
β-Galactosidase	116,3	0,023	2,623	0,452	17,2	12,6
Phosphorylase B	97,4	0,040	3,518	0,323	9,2	18,4
BSA	66,3	0,023	4,736	0,448	9,5	22,9
Glutamatdehydrogenase	55,4	0,069	4,531	0,771	17,0	21,0
Laktatdehydrogenase	36,5	0,046	12,346	0,639	5,2	41,8
Carboanhydrase	31,0	0,025	8,622	0,519	6,0	31,0
Trypsin Inhibitor	21,5	0,037	12,524	0,600	4,8	37,6
Lysozym	14,4	0,029	13,728	0,560	4,1	46,7
Aprotinin	6,0	0,044	15,557	2,060	13,2	49,4
Insulin B-Kette (64%)	3,5	0,129	-----	-----	-----	-----
Insulin A-Kette (35%)	2,5	-----	-----	-----	-----	-----
gesamt		0,508				

Tabelle 9-7: Mark¹² unstained Protein Standardlösung aufgetrennt auf einem Tris-Gel und mit der SYPRO Ruby - Färbung angefärbt, Detektor: Typhoon.

Protein	Mr [kDa]	Konz. [µg/µL]	Peakfläche		RSD%	S/N
			Mittelw.	STD		
Myosin	200,0	0,027	0,778	0,164	21,1	7,0
β-Galactosidase	116,3	0,014	1,024	0,113	11,0	9,3
Phosphorylase B	97,4	0,025	1,760	0,104	5,9	15,1
BSA	66,3	0,014	1,800	0,071	3,9	16,9
Glutamatdehydrogenase	55,4	0,042	2,359	0,454	19,2	17,5
Laktatdehydrogenase	36,5	0,028	7,548	0,304	4,0	49,6
Carboanhydrase	31,0	0,015	5,293	0,321	6,1	36,8
Trypsin Inhibitor	21,5	0,022	7,765	0,249	3,2	42,5
Lysozym	14,4	0,018	3,021	0,463	15,3	20,8
Aprotinin	6,0	0,027	3,101	1,029	33,2	16,9
Insulin B-Kette (64%)	3,5	0,078	-----	-----	-----	-----
Insulin A-Kette (35%)	2,5	-----	-----	-----	-----	-----
gesamt		0,309				

Tabelle 9-8: Mark¹² unstained Protein Standardlösung aufgetrennt auf einem Tris-Gel und mit der Deep Purple - Färbung angefärbt, Detektor: Typhoon.

Protein	Mr [kDa]	Konz. [µg/µL]	Peakfläche			S/N
			Mittelw.	STD	RSD%	
Myosin	200,0	0,044	0,338	0,131	38,7	5,6
β-Galactosidase	116,3	0,023	1,744	0,185	10,6	21,4
Phosphorylase B	97,4	0,040	2,561	0,393	15,3	24,4
BSA	66,3	0,023	2,972	0,367	12,3	28,7
Glutamatdehydrogenase	55,4	0,069	9,269	1,045	11,3	59,9
Laktatdehydrogenase	36,5	0,046	4,547	1,010	22,2	34,6
Carboanhydrase	31,0	0,025	4,571	0,695	15,2	29,6
Trypsin Inhibitor	21,5	0,037	4,539	0,356	7,9	40,6
Lysozym	14,4	0,029	8,368	1,215	14,5	56,2
Aprotinin	6,0	0,044	-----	-----	-----	-----
Insulin B-Kette (64%)	3,5	0,129	-----	-----	-----	-----
Insulin A-Kette (35%)	2,5	-----	-----	-----	-----	-----
gesamt	0,508					

Tabelle 9-9: Precision Plus ProteinTM prestained Standardlösung (Proteing Gesamtkonzentration 0,300 µg/µL) aufgetrennt auf einem NuPAGE-Gel und mit der BiosafeTM Coomassie - Färbung angefärbt, Detektor: Odyssey NIR Imaging System.

Protein	Peakfläche			S/N
	Mittelw.	STD	RSD%	
Protein 1	6,08	0,82	13,4	23,8
Protein 2	3,85	0,53	13,7	13,9
Protein 3	6,79	0,55	8,1	19,7
Protein 4	11,01	0,66	6,0	27,3
Protein 5	8,98	0,53	5,9	17,1
Protein 6	19,53	1,45	7,4	36,8
Protein 7	12,08	0,96	8,0	16,7
Protein 8	11,46	1,04	9,1	26,7
Protein 9	3,37	1,11	32,9	6,1
Protein 10	13,28	1,40	10,5	17,6

Tabelle 9-10: Precision Plus Protein™ prestained Standardlösung (Proteing Gesamtkonzentration 0,300 µg/µL) aufgetrennt auf einem NuPAGE-Gel und mit der Biosafe™ Coomassie - Färbung angefärbt, Detektor: Typhoon.

Protein	Peakfläche			S/N
	Mittelw.	STD	RSD%	
Protein 1	1,35	0,10	7,1	6,5
Protein 2	3,05	0,15	4,8	12,3
Protein 3	6,80	0,64	9,4	17,8
Protein 4	5,78	0,23	4,0	19,7
Protein 5	7,36	0,49	6,7	20,8
Protein 6	15,09	0,76	5,0	31,8
Protein 7	10,19	0,66	6,5	22,5
Protein 8	16,52	1,35	8,2	28,5
Protein 9	12,22	0,55	4,5	19,5
Protein 10	16,92	1,34	8,0	22,6

Tabelle 9-11: Precision Plus Protein™ prestained Standardlösung (Proteing Gesamtkonzentration 0,300 µg/µL) aufgetrennt auf einem Tris-Gel und mit der Biosafe™ Coomassie - Färbung angefärbt, Detektor: Typhoon.

Protein	Peakfläche			S/N
	Mittelw.	STD	RSD%	
Protein 1	6,022	0,455	7,549	25,3
Protein 2	3,742	0,449	11,994	17,7
Protein 3	6,630	0,128	1,924	28,0
Protein 4	9,587	0,555	5,788	39,5
Protein 5	8,820	0,354	4,018	32,3
Protein 6	15,896	0,922	5,798	54,5
Protein 7	11,777	0,587	4,983	35,9
Protein 8	12,065	0,659	5,466	37,8
Protein 9	9,192	0,976	10,617	15,9
Protein 10	12,667	0,915	7,226	37,6

Tabelle 9-12: Precision Plus Protein™ prestained Standardlösung (Proteingesamtkonzentration 0,300 µg/µL) aufgetrennt auf einem Tris-Gel und mit der Biosafe™ Coomassie - Färbung angefärbt, Detektor: Odyssey NIR Imaging System.

Protein	Peakfläche			S/N
	Mittelw.	STD	RSD%	
Protein 1	13,951	0,451	3,2	44,3
Protein 2	7,643	0,300	3,9	29,5
Protein 3	14,780	0,640	4,3	51,3
Protein 4	24,975	1,012	4,1	79,7
Protein 5	19,907	0,884	4,4	55,2
Protein 6	37,684	1,862	4,9	10,5
Protein 7	27,692	1,172	4,2	6,5
Protein 8	30,516	0,954	3,1	77,7
Protein 9	17,969	1,816	10,1	25,0
Protein 10	30,084	1,347	4,5	70,7

9.2 Berechnungen zum Plackett-Burman-Versuchsdesign

9.2.1 β -Galactosidase

Tabelle 9-13: Ergebnisse des Plackett-Burmann-Designs; Berechnung der Effekte für die β -Galactosidase.

Nr.	Mittelwert	Einflussfaktoren							Dummyfaktoren				Zielgröße RSD%
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
		Färbezeit	Entfärbezeit	Temp. d. Färbung	Temp. d. Elektroph.	Probenpuffer	Alter d. Gels	Gele					
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	19,5
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	6,6
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	9,0
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	11,5
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	17,7
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	6,9
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	5,3
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	7,0
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	23,3
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	6,8
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	8,9
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,4
Summe "+"	129,80	69,00	89,80	49,70	70,45	72,15	65,15	62,65	70,65	71,40	59,15	54,30	
Summe "-"	-----	60,80	40,00	80,10	59,35	57,65	64,65	67,15	59,15	58,40	70,65	75,50	
Gesamtsumme	129,80	129,80	129,80	129,80	129,80	129,80	129,80	129,80	129,80	129,80	129,80	129,80	
Differenz	129,80	8,20	49,80	-30,40	11,10	14,50	0,50	-4,50	11,50	13,00	-11,50	-21,20	
Effekt	21,6333	1,3667	8,3000	-5,0667	1,8500	2,4167	0,0833	-0,7500	1,9167	2,1667	-1,9167	-3,5333	

1. Berechnung der Effekte (s. Plackett-Burman-Tabelle):

$$E_k = \frac{\sum Y_{k(+)} }{N/2} - \frac{\sum Y_{k(-)} }{N/2}$$

2. Berechnung der Versuchsvarianz über die Dummyfaktoren:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum E_{(Di)}^2}{n}}$$

2.1 Summe der quadrierten Dummyfaktoren-Effekte: $(1,9167)^2 + (2,1667)^2 + (-1,9167)^2 + (-3,5333)^2 = 24,5261$

2.2 Berechnung der Varianz $\hat{\sigma}^2$ durch Division der Summe durch die Anzahl an Dummyfaktoren: $\hat{\sigma}^2 = \frac{24,5261}{6} = 6,1315$

2.3 Berechnung der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ durch Wurzelziehen aus der Varianz: $\hat{\sigma} = \sqrt{6,1315} = 2,4762$

3. Statistische Interpretation:

Vergleich jedes Effektes E_k mit dem Minimum Significant Factor Effect (MIN), ein Grenzwert, der die Versuchsvarianz innerhalb des Designs beschreibt und durch Multiplikation des t-Faktors mit der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ berechnet wird:

$$t\text{-Faktor} = 1,533 \text{ (mit } \alpha = 0,2 \text{ und Freiheitsgrade (= Anzahl der Dummyfaktoren) = 4)}$$

$$MIN = \hat{\sigma} \cdot t \rightarrow MIN = 2,4762 \cdot 1,533 = \mathbf{3,7965}$$

Ein Effekt wird als signifikant angesehen, wenn gilt: $|E_k| > MIN$; diese Effekte und ihre zugehörigen Faktoren sind in der Tabelle farbig gekennzeichnet.

9.2.2 Phosphorylase B

Tabelle 9-14: Ergebnisse des Plackett-Burmann-Designs; Berechnung der Effekte für die Phosphorylase B.

Nr.	Mittelwert	Einflussfaktoren							Dummyfaktoren				Zielgröße
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	RSD%
		Färbezeit	Entfärbezeit	Temp. d. Färbung	Temp. d. Elektroph.	Probenpuffer	Alter d. Gels	Gele					
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	7,8
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5,0
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	5,0
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	4,2
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	12,0
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	26,2
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	6,4
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	7,9
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	20,0
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	6,6
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	7,7
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,2
Summe "+"	115,90	61,75	56,60	36,30	50,75	74,60	48,40	71,05	77,65	55,45	57,40	62,25	
Summe "-"	-----	54,15	59,30	79,60	65,15	41,30	67,50	44,85	38,25	60,45	58,50	53,65	
Gesamtsumme	115,90	115,90	115,90	115,90	115,90	115,90	115,90	115,90	115,90	115,90	115,90	115,90	
Differenz	115,90	7,60	-2,70	-43,30	-14,40	33,30	-19,10	26,20	39,40	-5,00	-1,10	8,60	
Effekt	19,3167	1,2667	-0,4500	-7,2167	-2,4000	5,5500	-3,1833	4,3667	6,5667	-0,8333	-0,1833	1,4333	

1. Berechnung der Effekte (s. Plackett-Burman-Tabelle):

$$E_k = \frac{\sum Y_{k(+)} }{N/2} - \frac{\sum Y_{k(-)} }{N/2}$$

2. Berechnung der Versuchsvarianz über die Dummyfaktoren:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum E_{(Di)}^2}{n}}$$

2.1 Summe der quadrierten Dummyfaktoren-Effekte: $(6,5667)^2 + (-0,8333)^2 + (-0,1833)^2 + (1,4333)^2 = 45,9036$

2.2 Berechnung der Varianz $\hat{\sigma}^2$ durch Division der Summe durch die Anzahl an Dummyfaktoren: $\hat{\sigma}^2 = \frac{45,9036}{6} = 11,4759$

2.3 Berechnung der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ durch Wurzelziehen aus der Varianz: $\hat{\sigma} = \sqrt{11,4759} = 3,3876$

3. Statistische Interpretation:

Vergleich jedes Effektes E_k mit dem Minimum Significant Factor Effect (MIN), ein Grenzwert, der die Versuchsvarianz innerhalb des Designs beschreibt und durch Multiplikation des t-Faktors mit der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ berechnet wird:

t-Faktor = 1,533 (mit $\alpha = 0,2$ und Freiheitsgrade (= Anzahl der Dummyfaktoren) = 4)

$$\text{MIN} = \hat{\sigma} \cdot t \rightarrow \text{MIN} = 3,3876 \cdot 1,533 = \mathbf{5,1939}$$

Ein Effekt wird als signifikant angesehen, wenn gilt: $|E_k| > \text{MIN}$; diese Effekte und ihre zugehörigen Faktoren sind in der Tabelle farbig gekennzeichnet.

9.2.3 BSA

Tabelle 9-15: Ergebnisse des Plackett-Burmann-Designs; Berechnung der Effekte für BSA.

Nr.	Mittelwert	Einflussfaktoren							Dummyfaktoren				Zielgröße
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	RSD%
		Färbezeit	Entfärbezeit	Temp. d. Färbung	Temp. d. Elektroph.	Probenpuffer	Alter d. Gels	Gele					
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	9,0
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5,8
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	7,7
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	4,0
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	18,5
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	8,1
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	5,3
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	10,9
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	12,6
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	8,8
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	6,4
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,2
Summe "+"	108,10	54,10	58,10	43,45	49,10	52,70	58,80	45,05	66,60	56,95	44,90	51,65	
Summe "-"	-----	54,00	50,00	64,65	59,00	55,40	49,30	63,05	41,50	51,15	63,20	56,45	
Gesamtsumme	108,10	108,10	108,10	108,10	108,10	108,10	108,10	108,10	108,10	108,10	108,10	108,10	
Differenz	108,10	0,10	8,10	-21,20	-9,90	-2,70	9,50	-18,00	25,10	5,80	-18,30	-4,80	
Effekt	18,0167	0,0167	1,3500	-3,5333	-1,6500	-0,4500	1,5833	-3,0000	4,1833	0,9667	-3,0500	-0,8000	

1. Berechnung der Effekte (s. Plackett-Burman-Tabelle):

$$E_k = \frac{\sum Y_{k(+)} }{N/2} - \frac{\sum Y_{k(-)} }{N/2}$$

2. Berechnung der Versuchsvarianz über die Dummyfaktoren:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum E_{(Di)}^2}{n}}$$

2.1 Summe der quadrierten Dummyfaktoren-Effekte: $(4,1833)^2 + (0,9667)^2 + (-3,0500)^2 + (-0,8000)^2 = 28,3772$

2.2 Berechnung der Varianz $\hat{\sigma}^2$ durch Division der Summe durch die Anzahl an Dummyfaktoren: $\hat{\sigma}^2 = \frac{28,3772}{6} = 7,0943$

2.3 Berechnung der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ durch Wurzelziehen aus der Varianz: $\hat{\sigma} = \sqrt{7,0943} = 2,6635$

3. Statistische Interpretation:

Vergleich jedes Effektes E_k mit dem Minimum Significant Factor Effect (MIN), ein Grenzwert, der die Versuchsvarianz innerhalb des Designs beschreibt und durch Multiplikation des t-Faktors mit der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ berechnet wird:

$$t\text{-Faktor} = 1,533 \text{ (mit } \alpha = 0,2 \text{ und Freiheitsgrade (= Anzahl der Dummyfaktoren) = 4)}$$

$$MIN = \hat{\sigma} \cdot t \rightarrow MIN = 2,6635 \cdot 1,533 = \mathbf{4,0837}$$

Ein Effekt wird als signifikant angesehen, wenn gilt: $|E_k| > MIN$; diese Effekte und ihre zugehörigen Faktoren sind in der Tabelle farbig gekennzeichnet.

9.2.4 Glutamatdehydrogenase

Tabelle 9-16: Ergebnisse des Plackett-Burmann-Designs; Berechnung der Effekte für die Glutamatdehydrogenase.

Nr.	Mittelwert	Einflussfaktoren							Dummyfaktoren				Zielgröße RSD%
		1 Färbezeit	2 Entfärbezeit	3 Temp. d. Färbung	4 Temp. d. Elektroph.	5 Probenpuffer	6 Alter d. Gels	7 Gele	8	9	10	11	
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	4,3
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5,4
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	7,4
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	6,1
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	10,2
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	9,4
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	7,9
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	12,8
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	8,2
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	7,0
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	7,0
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,3
Summe "+"	90,75	42,25	43,10	45,45	40,10	46,95	49,05	45,45	54,90	50,45	47,80	47,20	
Summe "-"	-----	48,50	47,65	45,30	50,65	43,80	41,70	45,30	35,85	40,30	42,95	43,55	
Gesamtsumme	90,75	90,75	90,75	90,75	90,75	90,75	90,75	90,75	90,75	90,75	90,75	90,75	
Differenz	90,75	-6,25	-4,55	0,15	-10,55	3,15	7,35	0,15	19,05	10,15	4,85	3,65	
Effekt	15,1250	-1,0417	-0,7583	0,0250	-1,7583	0,5250	1,2250	0,0250	3,1750	1,6917	0,8083	0,6083	

1. Berechnung der Effekte (s. Plackett-Burman-Tabelle):

$$E_k = \frac{\sum Y_{k(+)} }{N/2} - \frac{\sum Y_{k(-)} }{N/2}$$

2. Berechnung der Versuchsvarianz über die Dummyfaktoren:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum E_{(Di)}^2}{n}}$$

2.1 Summe der quadrierten Dummyfaktoren-Effekte: $(3,1750)^2 + (1,6917)^2 + (0,8083)^2 + (0,6083)^2 = 13,9658$

2.2 Berechnung der Varianz $\hat{\sigma}^2$ durch Division der Summe durch die Anzahl an Dummyfaktoren: $\hat{\sigma}^2 = \frac{13,9658}{6} = 3,4915$

2.3 Berechnung der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ durch Wurzelziehen aus der Varianz: $\hat{\sigma} = \sqrt{3,4915} = 1,8685$

3. Statistische Interpretation:

Vergleich jedes Effektes E_k mit dem Minimum Significant Factor Effect (MIN), ein Grenzwert, der die Versuchsvarianz innerhalb des Designs beschreibt und durch Multiplikation des t-Faktors mit der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ berechnet wird:

$$t\text{-Faktor} = 1,533 \text{ (mit } \alpha = 0,2 \text{ und Freiheitsgrade (= Anzahl der Dummyfaktoren) = 4)}$$

$$MIN = \hat{\sigma} \cdot t \rightarrow MIN = 1,8685 \cdot 1,533 = \mathbf{2,8649}$$

Ein Effekt wird als signifikant angesehen, wenn gilt: $|E_k| > MIN$; diese Effekte und ihre zugehörigen Faktoren sind in der Tabelle farbig gekennzeichnet.

9.2.5 Laktatdehydrogenase

Tabelle 9-17: Ergebnisse des Plackett-Burmann-Designs; Berechnung der Effekte für die Laktatdehydrogenase.

Nr.	Mittelwert	Einflussfaktoren							Dummyfaktoren				Zielgröße RSD%
		1 Färbezeit	2 Entfärbezeit	3 Temp. d. Färbung	4 Temp. d. Elektroph.	5 Probenpuffer	6 Alter d. Gels	7 Gele	8	9	10	11	
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	3,7
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	4,6
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	6,3
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	3,8
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	8,0
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	5,4
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	5,3
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	5,4
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	3,9
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	5,7
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	3,8
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,5
Summe "+"	59,20	31,05	29,45	29,45	29,40	26,70	31,75	27,85	34,55	30,85	29,85	33,30	
Summe "-"	-----	28,15	29,75	29,75	29,80	32,50	27,45	31,35	24,65	28,35	29,35	25,90	
Gesamtsumme	59,20	59,20	59,20	59,20	59,20	59,20	59,20	59,20	59,20	59,20	59,20	59,20	
Differenz	59,20	2,90	-0,30	-0,30	-0,40	-5,80	4,30	-3,50	9,90	2,50	0,50	7,40	
Effekt	9,8667	0,4833	-0,0500	-0,0500	-0,0667	-0,9667	0,7167	-0,5833	1,6500	0,4167	0,0833	1,2333	

1. Berechnung der Effekte (s. Plackett-Burman-Tabelle):

$$E_k = \frac{\sum Y_{k(+)} }{N/2} - \frac{\sum Y_{k(-)} }{N/2}$$

2. Berechnung der Versuchsvarianz über die Dummyfaktoren:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum E_{(Di)}^2}{n}}$$

2.1 Summe der quadrierten Dummyfaktoren-Effekte: $(1,6500)^2 + (0,4167)^2 + (0,0833)^2 + (1,2333)^2 = 4,4242$

2.2 Berechnung der Varianz $\hat{\sigma}^2$ durch Division der Summe durch die Anzahl an Dummyfaktoren: $\hat{\sigma}^2 = \frac{4,4242}{6} = 1,1060$

2.3 Berechnung der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ durch Wurzelziehen aus der Varianz: $\hat{\sigma} = \sqrt{1,1060} = 1,0517$

3. Statistische Interpretation:

Vergleich jedes Effektes E_k mit dem Minimum Significant Factor Effect (MIN), ein Grenzwert, der die Versuchsvarianz innerhalb des Designs beschreibt und durch Multiplikation des t-Faktors mit der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ berechnet wird:

$$t\text{-Faktor} = 1,533 \text{ (mit } \alpha = 0,2 \text{ und Freiheitsgrade (= Anzahl der Dummyfaktoren) = 4)}$$

$$MIN = \hat{\sigma} \cdot t \rightarrow MIN = 1,0517 \cdot 1,533 = \mathbf{1,6125}$$

Ein Effekt wird als signifikant angesehen, wenn gilt: $|E_k| > MIN$; diese Effekte und ihre zugehörigen Faktoren sind in der Tabelle farbig gekennzeichnet.

9.2.6 Carboanhydrase

Tabelle 9-18: Ergebnisse des Plackett-Burmann-Designs; Berechnung der Effekte für die Carboanhydrase.

Nr.	Mittelwert	Einflussfaktoren							Dummyfaktoren				Zielgröße RSD%
		1 Färbezeit	2 Entfärbezeit	3 Temp. d. Färbung	4 Temp. d. Elektroph.	5 Probenpuffer	6 Alter d. Gels	7 Gele	8	9	10	11	
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	6,1
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	4,0
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	5,9
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	3,3
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	8,1
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	5,8
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	3,8
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	3,9
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	7,1
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	6,8
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	3,9
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7
Summe "+"	62,25	34,00	34,35	27,65	33,65	30,75	32,50	30,60	37,50	30,10	28,70	31,50	
Summe "-"	-----	28,25	27,90	34,60	28,60	31,50	29,75	31,65	24,75	32,15	33,55	30,75	
Gesamtsumme	62,25	62,25	62,25	62,25	62,25	62,25	62,25	62,25	62,25	62,25	62,25	62,25	
Differenz	62,25	5,75	6,45	-6,95	5,05	-0,75	2,75	-1,05	12,75	-2,05	-4,85	0,75	
Effekt	10,3750	0,9583	1,0750	-1,1583	0,8417	-0,1250	0,4583	-0,1750	2,1250	-0,3417	-0,8083	0,1250	

1. Berechnung der Effekte (s. Plackett-Burman-Tabelle):

$$E_k = \frac{\sum Y_{k(+)} }{N/2} - \frac{\sum Y_{k(-)} }{N/2}$$

2. Berechnung der Versuchsvarianz über die Dummyfaktoren:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum E_{(Di)}^2}{n}}$$

2.1 Summe der quadrierten Dummyfaktoren-Effekte:

$$(2,1250)^2 + (-0,3417)^2 + (-0,8083)^2 + (0,1250)^2 = 5,3014$$

2.2 Berechnung der Varianz $\hat{\sigma}^2$ durch Division der Summe durch die Anzahl an Dummyfaktoren: $\hat{\sigma}^2 = \frac{5,3014}{6} = 1,3253$

2.3 Berechnung der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ durch Wurzelziehen aus der Varianz: $\hat{\sigma} = \sqrt{1,3253} = 1,1512$

3. Statistische Interpretation:

Vergleich jedes Effektes E_k mit dem Minimum Significant Factor Effect (MIN), ein Grenzwert, der die Versuchsvarianz innerhalb des Designs beschreibt und durch Multiplikation des t-Faktors mit der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ berechnet wird:

t-Faktor = 1,533 (mit $\alpha = 0,2$ und Freiheitsgrade (= Anzahl der Dummyfaktoren) = 4)

$$\text{MIN} = \hat{\sigma} \cdot t \rightarrow \text{MIN} = 1,1512 \cdot 1,533 = \mathbf{1,7651}$$

Ein Effekt wird als signifikant angesehen, wenn gilt: $|E_k| > \text{MIN}$; diese Effekte und ihre zugehörigen Faktoren sind in der Tabelle farbig gekennzeichnet.

9.2.7 Trypsin Inhibitor

Tabelle 9-19: Ergebnisse des Plackett-Burmann-Designs; Berechnung der Effekte für den Trypsin Inhibitor.

Nr.	Mittelwert	Einflussfaktoren							Dummyfaktoren				Zielgröße RSD%
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
		Färbezeit	Entfärbezeit	Temp. d. Färbung	Temp. d. Elektroph.	Probenpuffer	Alter d. Gels	Gele					
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	5,5
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5,6
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	5,2
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	3,2
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	9,9
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	6,5
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	5,5
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	8,9
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	5,7
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	9,0
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	10,1
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,0
Summe "+"	80,95	39,65	39,45	41,95	36,40	42,25	48,85	39,95	45,05	38,70	34,75	42,70	
Summe "-"	-----	41,30	41,50	39,00	44,55	38,70	32,10	41,00	35,90	42,25	46,20	38,25	
Gesamtsumme	80,95	80,95	80,95	80,95	80,95	80,95	80,95	80,95	80,95	80,95	80,95	80,95	
Differenz	80,95	-1,65	-2,05	2,95	-8,15	3,55	16,75	-1,05	9,15	-3,55	-11,45	4,45	
Effekt	13,4917	-0,2750	-0,3417	0,4917	-1,3583	0,5917	2,7917	-0,1750	1,5250	-0,5917	-1,9083	0,7417	

1. Berechnung der Effekte (s. Plackett-Burman-Tabelle):

$$E_k = \frac{\sum Y_{k(+)} }{N/2} - \frac{\sum Y_{k(-)} }{N/2}$$

2. Berechnung der Versuchsvarianz über die Dummyfaktoren:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum E_{(Di)}^2}{n}}$$

2.1 Summe der quadrieren Dummyfaktoren-Effekte:

$$(1,5250)^2 + (-0,5917)^2 + (-1,9083)^2 + (0,7417)^2 = 6,8675$$

2.2 Berechnung der Varianz $\hat{\sigma}^2$ durch Division der Summe durch die Anzahl an Dummyfaktoren: $\hat{\sigma}^2 = \frac{6,8675}{6} = 1,1446$

2.3 Berechnung der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ durch Wurzelziehen aus der Varianz: $\hat{\sigma} = \sqrt{1,1446} = 1,0700$

3. Statistische Interpretation:

Vergleich jedes Effektes E_k mit dem Minimum Significant Factor Effect (MIN), ein Grenzwert, der die Versuchsvarianz innerhalb des Designs beschreibt und durch Multiplikation des t-Faktors mit der Standardabweichung $\hat{\sigma}$ berechnet wird:

t-Faktor = 1,533 (mit $\alpha = 0,2$ und Freiheitsgrade (= Anzahl der Dummyfaktoren) = 4)

$$MIN = \hat{\sigma} \cdot t \rightarrow MIN = 1,0700 \cdot 1,533 = 1,6303$$

Ein Effekt wird als signifikant angesehen, wenn gilt: $|E_k| > MIN$; diese Effekte und ihre zugehörigen Faktoren sind in der Tabelle farbig gekennzeichnet.

10 Literaturverzeichnis

- [1] Göber, B. and Surmann, P., Arzneimittelkontrolle - Drug Control, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2005.
- [2] Lottspeich, F. and Engels, J. W., Bioanalytik, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2006.
- [3] Marengo, E., Robotti, E., Antonucci, F., Cecconi, D., Campostrini, N. and Righetti, P. G., Proteomics 5 (2005) 654-666.
- [4] Palagi, P. M., Hernandez, P., Walther, D. and Appel, R. D., Proteomics 6 (2006) 5435-5444.
- [5] Raman, B., Cheung, A. and Marten, M. R., Electrophoresis 23 (2002) 2194-2202.
- [6] Righetti, P. G., Castagna, A., Antonucci, F., Piubelli, C., Cecconi, D., Campostrini, N., Antonioli, P., Astner, H. and Hamdan, M., J. Chromatogr. A 1051 (2004) 3-17.
- [7] Clark, B. N. and Gutstein, H. B., Proteomics 8 (2008) 1197-1203.
- [8] Kirchmair, J., Markt, P., Distinto, S., Schuster, D., Spitzer, G. M., Liedl, K. R., Langer, T. and Wolber, G., J. Med. Chem. 51 (2008) 7021-7040.
- [9] Michov, B., Elektrophorese: Theorie und Praxis, de Gruyter, Berlin, 1995.
- [10] Ornstein, L., Ann. NY Acad. Sci. 121 (1964) 321-349.
- [11] Davis, B. J., Ann. NY Acad. Sci. 121 (1964) 404-427.
- [12] Shapiro, A. L., Vinuela, E. and Maizel, J. V., Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 (1967) 815-820.
- [13] Righetti, P. G., Bossi, A. and Gelfi, C. in: Hames, B. D.: Gel Electrophoresis of Proteins - A Practical Approach. 3. Edition, Oxford University Press, Oxford, 1998, 127-187.
- [14] Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R. and Postel, W., J. Biochem. Biophys. Methods 6 (1982) 317-339.
- [15] Wagner, H. and Blasius, E., Praxis der elektrophoretischen Trennmethode, Springer-Verlag, Heidelberg, 1989.
- [16] O'Farrell, P. H., J. Biol. Chem. 250 (1975) 4007-4021.
- [17] Klose, J., Humangenetik 26 (1975) 231-243.
- [18] Dale, G. and Latner, A. L., Clin. Chim. Acta 24 (1969) 61-68.

- [19] Kenrick, K. G. and Margolis, J., Anal. Biochem. 33 (1970) 204-207.
- [20] Görg, A., Postel, W. and Günther, S., Electrophoresis 9 (1988) 531-546.
- [21] Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. and Weiss, W., Electrophoresis 21 (2000) 1037-1053.
- [22] Kellner, R., Fresenius J. Anal. Chem. 366 (2000) 517-524.
- [23] Winters, M. E., Lowenthal, M., Feldman, A. L. and Liotta, L. A. in: Detrick, B., Hamilton, R. G. and Folds, J. D.: Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology. 7th Edition, American Society for Microbiology, Washington, DC, 2006, 1183-1192.
- [24] Hong, M. L. W., Jiang, N., Gopinath, S. and Chew, F. T., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 33 (2006) 563-568.
- [25] Little, M. J., Paquette, D. M. and Roos, P. K., Electrophoresis 27 (2006) 2477-2485.
- [26] Drews, J., Science 287 (2000) 1960-1964.
- [27] Gomase, V. S., Kale, K. V., Tagore, S. and Hatture, S. R., Curr. Drug Metab. 9 (2008) 213-220.
- [28] Walsh, G., Nat. Biotechnol. 18 (2000) 831-833.
- [29] Walsh, G., Nat. Biotechnol. 21 (2003) 865-870.
- [30] Walsh, G., Nat. Biotechnol. 24 (2006) 769-776.
- [31] <http://www.vfa.de/de/forschung/am-entwicklung/amzulassungen-gentec.html>.
- [32] Oliva, A., Farina, J. B. and Llabrés, M., Curr. Pharm. Anal. 3 (2007) 230-248.
- [33] ICH Guideline Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005) www.ich.org.
- [34] Wätzig, H. and Ermer, J., PZ Prisma 10 (2003) 257-265.
- [35] European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) Official Edition, 2.4.46 Chromatographische Trennmethode, 6. edition, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 2008.
- [36] United States Pharmacopeia (USP), Chapter: Interpretation of chromatograms, 29. edition, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2006.
- [37] Wätzig, H., Degenhardt, M. and Kunkel, A., Electrophoresis 19 (1998) 2695-2752.
- [38] Wätzig, H., PZ Prisma 9 (2002) 240-244.

- [39] Wätzig, H. in: Nürnberg, E. and Surmann, P.: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Band 2. 5. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 1991, 1048-1084.
- [40] Aschermann, K. and Wattenberg, A., Pharm. Ind. 70 (2008) 535-540.
- [41] Nishihara, J. C. and Champion, K. M., Electrophoresis 23 (2002) 2203-2215.
- [42] Blomberg, A., Blomberg, L., Norbeck, J., Fey, S. J., Larsen, P. M., Larsen, M., Roepstorff, P., Degand, H., Boutry, M., Posch, A. and Görg, A., Electrophoresis 16 (1995) 1935-1945.
- [43] Molloy, M. P., Brzezinski, E. E., Hang, J., McDowell, M. T. and VanBogelen, R. A., Proteomics 3 (2003) 1912-1919.
- [44] Mahon, P. and Dupree, P., Electrophoresis 22 (2001) 2075-2085.
- [45] Challapalli, K. K., Zabel, C., Schuchhardt, J., Kaendl, A. M., Klose, J. and Herzog, H., Electrophoresis 25 (2004) 3040-3047.
- [46] Koller, A. and Wätzig, H., Electrophoresis 26 (2005) 2470-2475.
- [47] Anderson, N. G. and Anderson, N. L., Anal. Biochem. 85 (1978) 331-340.
- [48] Anderson, N. L. and Anderson, N. G., Anal. Biochem. 85 (1978) 341-354.
- [49] Görg, A., Postel, W., Günther, S. and Weser, J., Electrophoresis 6 (1985) 599-604.
- [50] Westermeier, R., Postel, W., Weser, J. and Görg, A., J. Biochem. Biophys. Methods 8 (1983) 321-330.
- [51] Moritz, B. and Meyer, H. E., Proteomics 3 (2003) 2208-2220.
- [52] Patton, W. F., J. Chromatogr. B 771 (2002) 3-31.
- [53] Miller, I., Crawford, J. and Gianazza, E., Proteomics 6 (2006) 5385-5408.
- [54] Harris, L. R., Churchward, M. A., Butt, R. H. and Coorsen, J. R., J. Proteome Res. 6 (2007) 1418-1425.
- [55] Cristea, I. M., Gaskell, S. J. and Whetton, A. D., Blood 103 (2004) 3624-3634.
- [56] Neuhoff, V., Stamm, R. and Eibl, H., Electrophoresis 6 (1985) 427-448.
- [57] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Erhardt, W., Electrophoresis 9 (1988) 255-262.
- [58] Sitek, B., Scheibe, B., Jung, K., Schramm, A. and Stühler, K. in: Hamacher, M., Marcus, K., Stühler, K., vanHall, A., Warscheid, B. and Meyer, H. E.: Proteomics in Drug Research. Wiley-VCH, Weinheim, 2006, 33-55.

- [59] Poland, J., Rabilloud, T. and Sinha, P. in: Walker, J. M.: The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, Totowa, 2005, 177-184.
- [60] Mackintosh, J. A., Choi, H.-Y., Bae, S.-H., Veal, D. A., Bell, P. J., Ferrari, B. C., Dyk, D. D. V., Verrills, N. M., Paik, Y.-K. and Karuso, P., *Proteomics* 3 (2003) 2273-2288.
- [61] Tannu, N. S., Sanchez-Brambila, G., Kirby, P. and Andacht, T. M., *Electrophoresis* 27 (2006) 3136-3143.
- [62] Warscheid, B. in: Hamacher, M., Marcus, K., Stühler, K., vanHall, A., Warscheid, B. and Meyer, H. E.: *Proteomics in Drug Research*. Wiley-VCH, Weinheim, 2006, 57-88.
- [63] Ünlü, M., Morgan, M. E. and Minden, J. S., *Electrophoresis* 18 (1997) 2071-2077.
- [64] Alban, A., David, S. O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S. and Currie, I., *Proteomics* 3 (2003) 36-44.
- [65] Bergh, G. V. d. and Arckens, L., *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (2004) 38-43.
- [66] Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I. and Davison, M., *Proteomics* 1 (2001) 377-396.
- [67] Timms, J. F. and Cramer, R., *Proteomics* 8 (2008) 4886-4897.
- [68] Rabilloud, T., Strub, J.-M., Luche, S., Dorsselaer, A. v. and Lunardi, J., *Proteomics* 1 (2001) 699-704.
- [69] Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P. G., *Electrophoresis* 25 (2004) 1327-1333.
- [70] McDonough, J. and Marbà, E., *Proteomics* 5 (2005) 2892-2895.
- [71] Zhou, S., Bailey, M. J., Dunn, M. J., Preedy, V. R. and Emery, P. W., *Proteomics* 2 (2005) 2739-2747.
- [72] Zuo, X. and Speicher, D. W., *Electrophoresis* 21 (2000) 3035-3047.
- [73] Schirm, B. and Wätzig, H., *Chromatographia* 48 (1998) 331-346.
- [74] Zabel, C., Chamrad, D. C., Priller, J., Woodman, B., Meyer, H. E., Bates, G. P. and Klose, J., *Mol. Cell Proteomics* 1 (2002) 366-375.
- [75] Klose, J. and Kobalz, U., *Electrophoresis* 16 (1995) 1034-1059.
- [76] Klose, J., *Methods Mol. Biol.* 112 (1999) 147-172.

- [77] Koutny, L. B. and Yeung, E. S., Anal. Chem. 65 (1993) 183-187.
- [78] Zhang, H. and Yeung, E. S., Electrophoresis 27 (2006) 3609-3618.
- [79] Sluszný, C. and Yeung, E. S., Anal. Chem. 76 (2004) 1359-1365.
- [80] Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M. and Kang, C., Bull. Korean Chem. Soc. 23 (2002) 1511-1512.
- [81] Loebke, C., Sueltmann, H., Schmidt, C., Henjes, F., Wiemann, S., Poustka, A. and Korf, U., Proteomics 7 (2007) 558-564.
- [82] Luo, S., Wehr, N. B. and Levine, R. L., Anal. Biochem. 350 (2006) 233-238.
- [83] ODYSSEY Infrared Imaging System, LiCor Biosciences www.licor.com.
- [84] Patonay, G. and Antoine, M. D., Anal. Chem. 63 (1991) 321-327.
- [85] Schmitz, S., Laborjournal (2007) 42-43.
- [86] Bukallah, S. B., Rauf, M. A. and Ashraf, S., Dyes Pigm. 72 (2007) 353-356.
- [87] Smejka, G. B., Expert Rev. Proteomics 1 (2004) 381-387.
- [88] Sachs, L., Angewandte Statistik, Anwendung statistischer Methoden, 10. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 2002.
- [89] Häusler, H., Niehörster, M. and Wörns, K. P., Pharm. Ind. 61 (1999) 935-939.
- [90] Köppel, H., Schneider, B. and Wätzig, H., Pharm. Ind. 65 (2003) 619-623.
- [91] Rechenberg, W., Fresenius Z. Anal. Chem. 311 (1982) 590-597.
- [92] Hartung, J., Elpelt, B. and Klösener, K. H., Statistik, Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik, 14. Auflage, Oldenbourg, München, 2005.
- [93] Johnson, N. L. and Leone, F. C., Statistics and Experimental Design in Engineering and Physical Sciences, Volume I, second edition, John Wiley & Sons, New York, 1977.
- [94] Kucera, J. and Faltejsek, J., Fresenius J Anal Chem 352 (1995) 80-86.
- [95] Lozán, J. L. and Kausch, H., Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler, 3. Auflage, Wissenschaftliche Auswertungen, Hamburg, 2004.
- [96] Kaiser, R. E. and Mühlbauer, J. A., Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten, Band 774, 2. Auflage, B-I-Hochschultaschenbücher, Bibliographisches Institut Mannheim, 1983.
- [97] Coombs, C. H., Dawes, R. M. and Tversky, A., Mathematische Psychologie, Eine Einführung, Beltz Verlag, Weinheim und Basel, 1975.
- [98] Egan, W. J. and Morgan, S. L., Anal. Chem. 70, No. 11 (1998) 2372-2379.
- [99] Liang, Y.-Z. and Kvalheim, O. M., Chemom. Intel. Lab. Syst. 32 (1996) 1-10.

- [100] Walczak, B. and Massart, D. L., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 27 (1995) 41-54.
- [101] Wehrens, R., Putter, H. and Buydens, L. M. C., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 54 (2000) 35-52.
- [102] Manteiga, W. G., Sanchez, J. M. P. and Romo, J., *Computational Statistics* 9 (1994) 165-205.
- [103] Efron, B., *Journal of the American Statistical Association* 95 (2000) 1293-1296.
- [104] Efron, B., *Statistical Science* 18 (2003) 135-140.
- [105] Carpenter, J. and Bithell, J., *Statist. Med.* 19 (2000) 1141-1164.
- [106] Imaizumi, Y., Suzuki, N. and Shiraishi, H., *J. Chemometrics* 20 (2006) 68-75.
- [107] Deng, X., *Dissertation Braunschweig in Vorbereitung.*
- [108] Deng, X., Schröder, S. and Wätzig, H., *in Vorbereitung.*
- [109] Guha, R., Dutta, D., Jurs, P. C. and Chen, T., *J. Chem. Inf. Model.* 46 (2006) 1713-1722.
- [110] Plackett, R. L. and Burman, J. P., *Biometrika* 33 (1946) 305-325.
- [111] Petersen, H., *Grundlagen der Statistik und der statistischen Versuchsplanung, Band 2*, ecomed Verlagsgesellschaft mbH, 1991.
- [112] VanderHeyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B. G. M. and Massart, D. L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 723-753.
- [113] Dejaegher, B. and VanderHeyden, Y., *LC-GC Eur.* (2007) 526-532.
- [114] Dejaegher, B. and VanderHeyden, Y., *LC-GC Eur.* (2008) 96-102.
- [115] VanderHeyden, Y., Hartmann, C., Massart, D. L., Michel, L., Kiechle, P. and Erni, F., *Anal. Chim. Acta* 316 (1995) 15-26.
- [116] VanderHeyden, Y., Luypaert, K., Hartmann, C., Massart, D. L., Hoogmartens, J. and Beer, J. D., *Anal. Chim. Acta* 312 (1995) 245-262.
- [117] Volpato, G., Rodrigues, R. C., Heck, J. X. and Ayub, M. A. Z., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008) 821-828.
- [118] Ma, F.-X., Kim, J. H., Kim, S. B., Seo, Y.-G., Chang, Y. K., Hong, S.-K. and Kim, C.-J., *Process Biochem.* 43 (2008) 954-960.
- [119] Jia, B., Jin, Z. H. and Mei, L. H., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 144 (2008) 133-143.
- [120] Chauhan, K., Trivedi, U. and Patel, K. C., *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 98-103.

- [121] Schimmel, T. G. and Parsons, S. J., *Biotechnology Techniques* 13 (1999) 379-384.
- [122] Vindevogel, J. and Sandra, P., *Anal. Chem.* 63 (1991) 1530-1536.
- [123] Rizvi, S. A. A. and Shamsi, S. A., *Electrophoresis* 28 (2007) 1762-1778.
- [124] Boonkerd, S., Detaevernier, M. R., VanderHeyden, Y., Vindevogel, J. and Michotte, Y., *J. Chromatogr., A* 736 (1996) 281-289.
- [125] Lauwers, S., VanderHeyden, Y. and Rombaut, B., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 131-142.
- [126] Lauwers, S., VanderHeyden, Y. and Rombaut, B., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 659-668.
- [127] Sanz, J., Pérez, M., Martinez, M. T. and Plaza, M., *Talanta* 50 (1999) 149-164.
- [128] Sanz, J., Pérez, M., Martinez, M. T. and Plaza, M., *Talanta* 51 (2000) 849-862.
- [129] Babu, C. V. S. and Divakar, S., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 49-52.
- [130] Box, G. E. P., Hunter, W. G. and Hunter, J. S., *Statistic for Experimenters, An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*, John Wiley & Sons, New York, 1978.
- [131] VanderHeyden, Y. and Massart, D. L. in: Hendriks, M. M. W. B., deBoer, J. H. and Smilde, A. K.: *Robustness of analytical chemical methods and pharmaceutical technological products*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1996, pp 79-147.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Simone Schröder
Geburtsdatum: 15. August 1978
Geburtsort: Stadthagen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

seit Juni 2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Pharmazeutische Chemie der Technischen
Universität Braunschweig
Okt. 2007 – Nov. 2007 Forschungsaufenthalt am College of Pharmacy der
University of Rhode Island, Kingston, RI, USA
April 2005 – Mai 2005 Beschäftigung als Apothekerin in der Till-Apotheke
in Schöppenstedt (Inh.: Isolde Leibner)
03. Februar 2005 Approbation als Apothekerin
Juni 2004 – Dez. 2004 zweiter Abschnitt der praktischen Ausbildung:
Solvay Pharmaceuticals Hannover in der Abteilung
Analytical Support
Dez. 2003 – Juni 2004 erster Abschnitt der praktischen Ausbildung:
Lehndorfer Apotheke in Braunschweig
(Inh.: Edith Bergfeld)

Hochschulstudium

1999 – 2003 Studium der Pharmazie an der TU Braunschweig

Schulbildung

1998 – 1999 Sabine-Blindow-Schule Hannover
Fachrichtung: Pharmazeutisch – Technische – Assistentin
1991 – 1998 Gymnasium Bad Nenndorf (Allgemeine Hochschulreife)
1989 – 1991 Orientierungsstufe Bad Nenndorf
1985 – 1989 Grundschule Haste